

**Zur Produktion von Staphylokokkenenterotoxin B
in verschiedenen flüssigen Nährmedien**

Barbara Richter

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0015

Aus dem Bereich Hygiene und Technologie der Lebensmittel
tierischen Ursprungs der Universität München

- Tierärztliche Fakultät -

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h.c. L. Kotter und Prof. Dr. G. Terplan

Zur Produktion von Staphylokokkenenterotoxin B
in verschiedenen flüssigen Nährmedien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Barbara Richter
aus Hannover

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme
Referent: Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. G. Witzigmann

Tag der Promotion: 22.2.1974

MEINEN ELTERN

ZUM DANK





INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung	
2. Schrifttum	2
2.1. Enterotoxintypen und Referenzstämme	2
2.2. Enterotoxinbildung	4
2.3. Einfluß extrazellulärer Faktoren auf die Enterotoxin- bildung	12
2.3.1. Züchtungsverfahren	12
2.3.2. Nährmedien	13
2.3.3. Bebrütungstemperatur	28
2.3.4. pH-Wert	31
2.3.5. Sauerstoffspannung	34
3. Eigene Untersuchungen	40
3.1. Material	40
3.2. Methodik	40
3.2.1. Enterotoxingewinnung	40
3.2.1.1. Verschiedene Nährmedien	41
3.2.1.2. Verschiedene Zusätze	44
3.2.1.3. Verschiedene pH-Werte	47
3.2.1.4. Verschiedene Arten der Belüftung des Mediums	48
3.2.2. Nachweisverfahren	51
3.3. Ergebnisse der Untersuchungen über die Einflüsse verschie- dener Faktoren auf die Bildung von Enterotoxin B	54
3.3.1. Einfluß des Nährmediums	54
3.3.2. Einfluß verschiedener Zusätze	70
3.3.3. Einfluß des pH-Wertes	85
3.3.4. Einfluß unterschiedlicher Belüftung des Mediums	91
4. Diskussion	98
5. Zusammenfassung	114
Summary	115
6. Schrifttumsverzeichnis	

1. Einleitung

Staphylokokkenenterotoxinvergiftungen rangieren in der Statistik in Abhängigkeit von den Verzehrsgewohnheiten und der Leistungsfähigkeit der jeweiligen diagnostischen Institutionen an der Spitze bakterieller Lebensmittelvergiftungen. Gegenwärtig sind nur wenige Institute in der Lage, den zuverlässigen serologischen Nachweis durchzuführen. Dies hängt u.a. damit zusammen, daß die erforderlichen Reagenzien nur beschränkt verfügbar und darüber hinaus sehr teuer sind. Primär ist dafür der Mangel an Antigen verantwortlich, das erst mittels aufwendiger Reinigungsverfahren aus dem Roh toxin gewonnen werden kann. Da bei der Reinigung erhebliche Verluste an Toxin auftreten, sind kulturelle Verfahren mit möglichst großer Ergiebigkeit Voraussetzung für eine rationelle Gewinnung. Mir wurde die Aufgabe gestellt, optimale Bedingungen für die Produktion von Enterotoxin B hinsichtlich Nährbodenzusammensetzung und anderer Faktoren (pH-Wert, Schüttelgeschwindigkeit des Brutschrankes, Einleitung von Gasen etc.) zu ermitteln.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Enterotoxintypen und Referenzstämme

Enterotoxin ist ein aus einer Vielzahl von Aminosäuren (BERGDOLL, 1970) bestehendes Protein, das von ca. 50% der koagulasepositiven Staphylokokken (LACHICA et al., 1969) unter bestimmten Bedingungen in Lebensmitteln und geeigneten Nährmedien produziert wird (BERGDOLL, 1969). Allerdings ist auch in einigen Fällen über die Isolierung enterotoxinogener koagulasenegativer Staphylokokken berichtet worden (BERGDOLL, 1970; 1972). Als Eiweiß ist Enterotoxin in der Lage, in lebenden Organismen die Bildung spezifischer Antikörper anzuregen. Nachdem BERGDOLL, SURGALLA und DACK (1959) der Nachweis eines spezifischen präzipitierenden Antikörpers mit Enterotoxin-neutralisierenden Eigenschaften gelungen war, war die Basis für den in vitro-Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin gegeben. Bei diesen Untersuchungen wurde auch die früher von SURGALLA, BERGDOLL und DACK (1953) geäußerte Vermutung bestätigt, daß es verschiedene immunologische Enterotoxintypen gibt. Die heute gebräuchliche Einteilung der Enterotoxine in die einzelnen Typen erfolgt aufgrund einer Übereinkunft während einer Tagung der Amerikanischen Gesellschaft für Mikrobiologie in Kansas City (CASMAN, BERGDOLL und ROBINSON, 1963). Bis dahin wurde auf Vorschlag von CASMAN (1960) das von *Staphylococcus aureus* 196 E produzierte Enterotoxin mit dem Buchstaben "F" bezeichnet, da dieser, wie auch andere "food poisoning"-Stämme, bei einer Lebensmittelvergiftung isoliert worden war. Der Stamm S-6 bildete, wie die meisten anderen "enteritis"-Stämme, zwei Enterotoxine (BERGDOLL, SURGALLA und DACK, 1959), die mit den Buchstaben "E" und "F" belegt wurden. Um die Bezeichnung weiterer Enterotoxintypen zu erleichtern, wurde eine Benennung in alphabetischer Reihenfolge empfohlen. Der Enterotoxintyp "F" wurde in Enterotoxin A, der Typ "E" in Enterotoxin B umbenannt. Weitere, in der Folgezeit identifizierbare Typen sollten mit den folgenden Buchstaben des Alphabets gekennzeichnet werden. Als Referenzstämme wurden *Staphylococcus aureus* 196 E (ATCC 13565) als Bildner von Enterotoxin A und *Staphylococcus aureus* 243 (ATCC 14458) als Bildner

von Enterotoxin B gewählt. Auf den Stamm S-6 (ATCC 13566) als Referenzstamm für Enterotoxin B wurde verzichtet, da er auch geringe Mengen Enterotoxin A bildet (CASMAN, BERGDOLL und ROBINSON, 1963).

Das von BERGDOLL, BORJA und AVENA (1965) identifizierte Enterotoxin C wird in die Varianten C₁ (BORJA und BERGDOLL, 1967) und C₂ (AVENA und BERGDOLL, 1967) unterteilt. Diese Differenzierung wird aufgrund einiger unterschiedlicher physicochemischer Eigenschaften - z.B. zweier verschiedener isoelektrischer Punkte (C₁ bei 8,6; C₂ bei 7,0) - getroffen (AVENA und BERGDOLL, 1967). Enterotoxin C₁ wird vom Stamm 137, Enterotoxin C₂ vom Stamm 361 produziert. Als Referenzstamm gilt *Staphylococcus aureus* 137 - ATCC 19095 - (BERGDOLL, BORJA und AVENA, 1965). Die Entdeckung eines vierten Enterotoxins (Typ D) gelang CASMAN et al. (1967). Als Referenzstamm wurde der *Staphylococcus aureus* 494 (ATCC 23235) benannt. Enterotoxin E, das vom Stamm FRI - 326 gebildet wird, isolierten BERGDOLL et al. (1971). Angaben, ob dieser Stamm auch Referenzstamm ist und welche ATCC-Nummer ihm gegeben wurde, sind nicht bekannt.

2.2. Enterotoxinbildung

Die größten Enterotoxinmengen werden von Enterotoxin B-bildenden Staphylokokkenstämmen produziert, gefolgt von Enterotoxin C-Bildnern (BERGDOLL, 1972). Enterotoxin A-Bildner produzieren nur etwa 1/50 dessen, was bei Enterotoxin B-Bildnern festgestellt wurde (KATO et al., 1966). REISER und WEISS (1969) erzielten optimal ca. 350 mcg Enterotoxin B/ml, ca. 60 mcg Enterotoxin C/ml und nur 5 - 6 mcg Enterotoxin A/ml.

Nach Untersuchungen des Food Research Institute of the University of Wisconsin wird die Enterotoxigenität der Staphylokokken folgendermaßen beurteilt: gering: bei Typ A weniger als 2 mcg/ml; bei Typ B und C weniger als 5mcg/ml; mittel: bei Typ A 2 - 7 mcg/ml; bei Typ B 5 - 75 mcg/ml; bei Typ C 5 - 50 mcg/ml; stark: bei Typ A über 10 mcg/ml; bei Typ B über 75 mcg/ml; bei Typ C über 50 mcg/ml (WEISS und ROBBINS, 1970). Angaben über das Enterotoxinbildungsvermögen von Enterotoxin D- bzw. E-produzierenden Stämmen liegen nicht vor.

SUGIYAMA, BERGDOLL und DACK (1960) stellten bei Verimpfung von S-6-Kulturen auf antiserumhaltige Agarplatten fest, daß nach der Bebrütung um die Kolonien unterschiedlich große Präzipitationshöfe ausgebildet waren bzw. sogar fehlten. Weitergehende Untersuchungen erbrachten, daß eine Korrelation zwischen Größe des Präzipitationshofes und Enterotoxinbildungsvermögen der betreffenden Kolonie besteht. Aus der Größe dieses Hofes lassen sich somit Rückschlüsse auf das Enterotoxinbildungsvermögen derart ziehen, daß von Kolonien ohne Präzipitationshof nur sehr wenig Enterotoxin, von Kolonien mit großem Präzipitationshof dagegen viel Enterotoxin gebildet wird. Durch sukzessive Auswahl von Kolonien, die jeweils von einem maximalen Hof umgeben waren, konnten die Autoren Kulturen

gewinnen, die im Vergleich zur Ausgangskultur höhere Enterotoxinmengen produzierten.

Nach BERGDOLL (1972) kann auch bei Enterotoxin C-bildenden Stämmen durch eine derartige Selektion eine erhebliche Steigerung der Enterotoxinproduktion erzielt werden, während bei Enterotoxin A-Bildnern höchstens eine zweifache Zunahme zu beobachten war. Eine ca. 20fache Steigerung des Enterotoxin A-Ertrages erreichten FRIEDMAN und HOWARD (1971), nachdem sie den Stamm 100 der Einwirkung von N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) - einem mutagen wirkenden Agens - aussetzten. Dabei wurden während der fortlaufenden Selektion jeweils die Mutanten, die am meisten Enterotoxin bildeten, ausgewählt und einer erneuten Behandlung mit NTG unterzogen. Hierbei war ein stetiger Anstieg in der Produktion von Enterotoxin A zu registrieren. Anstatt der von Stamm 100 produzierten 3 mcg/ml erhielten FRIEDMAN und HOWARD beim Stamm 13N-2909 schließlich 57 mcg/ml. Im Verlauf dieser Toxinsteigerung kam es zu einer Verlängerung der lag-Phase.

Während bei diesem Stamm bisher keine Tendenz zu einer allmählichen Abnahme der Toxinproduktion zu verzeichnen war, war bei den durch einfache Selektion gewonnenen Enterotoxin B- bzw. Enterotoxin C-produzierenden Kulturen nach einigen Überimpfungen eine erhebliche Abnahme zu registrieren (BERGDOLL, 1972).

Enterotoxin wird offensichtlich in der Bakterienwand gebildet (FRIEDMAN und WHITE, 1966; FRIEDMAN, 1966 und 1968; GENIGEORGIS und SADLER, 1966). Die ersten Untersuchungen zu dieser Frage (FRIEDMAN und WHITE, 1965) unter Verwendung von Fluoresceinisothiocyanat-gekoppelten Antikörpern wiesen auf eine Fluoreszenz in den zwischen den einzelnen Keimen bestehenden Zwischenräumen hin. Aufgrund des gleichzeitigen Nachweises von Enterotoxin B im Einfach-

Gel-Diffusionstest wurde geschlossen, daß Enterotoxin lose an die Oberfläche der Keime gebunden ist. Im Zusammenhang mit der früher (MULLETT und FRIEDMAN, 1961) beobachteten Hemmung der Enterotoxinbildung nach Zusatz von Kulturfiltraten verschiedener Medien (speziell Hirn-Herz-Medium) wurde dann der Einfluß verschiedener anorganischer und organischer Substanzen bei einem Anfangs-pH von 7,7 geprüft (FRIEDMAN, 1966). Die Ergebnisse sind auszugsweise in Übersicht 1 wiedergegeben.

Übersicht 1: Hemmung der Bildung von Enterotoxin B durch verschiedene Substanzen (nach FRIEDMAN, 1966)

Substanz	Konzentration (μ mol/ml)	Hemmung (%)
K ₂ HPO ₄	36,74	100
KCl	53,66	100
CoCl ₂	1,68	100
NaF	57,14	100
Phenyläthanol	16,37	79
Acriflavin	0,002*	100
Streptomycinsulfat	0,0007	100
Chloramphenicol	0,009	57
Sperminphosphat	0,3	100
Spermidinphosphat	0,18	100
Tween 80	6,0*	100

* mg/ml

Auffällig war, daß das Wachstum der Staphylokokken häufig im Vergleich zur Kontrolle nicht eingeschränkt war. Durch Herabsetzen des Anfangs-pH von 7,7 auf mindestens 7,5 bzw. 7,3 wurde die die

Enterotoxinbildung hemmende Wirkung von K_2HPO_4 , KCl, Acriflavin und Spermin um mehr als 50%, jene von $CoCl_2$ und Tween 80 um weniger als 50% gemindert. Auch durch Zusatz von NH_4^+ , Mg^{++} oder Ca^{++} ließ sich die Hemmung bei der Mehrzahl der aufgeführten Inhibitoren verringern. Als Ursachen für die Hemmung wurden folgende Möglichkeiten diskutiert: Hemmung der Desoxiribonucleinsäure-Synthese (Acriflavin und Phenyläthanol), Verzögerung der Vermehrung von Staphylokokken infolge Reaktion (Co^{++}) mit Serin, das selbst die Enterotoxinbildung von *Staphylococcus aureus* S-6, nicht aber jene von *Staphylococcus aureus* 243 hemmt (FRIEDMAN, 1968), Hemmung enzymatischer Systeme, die Mg^{++} erfordern (K^+ und NaF), Hemmung der Proteinsynthese (Streptomycin, Chloramphenicol, Spermin). Es wurde angenommen, daß Streptomycin, Chloramphenicol, Spermin sowie Tween 80 die Durchlässigkeit der Zellwand verändern und somit Einfluß auf die Synthese zellulärer Produkte wie Enterotoxin nehmen. Auf den hemmenden Einfluß von Streptomycin wiesen im Übrigen auch ROSENWALD und LINCOLN (1966) hin, wobei sie als Ursache in Betracht zogen, daß es infolge Veränderung der Bakterienwand nicht zu einer Freisetzung des Enterotoxins kommt.

Weitere Untersuchungen über den Einfluß verschiedener chemischer, auf die Bakterienzellwand einwirkender Verbindungen wurden auch mit dem Stamm *Staphylococcus aureus* 243 von FRIEDMAN (1968) vorgenommen. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Enterotoxin B-bildenden Stämmen S-6 und 243 (Übersicht 2).

Die durch Penicillin ausgelöste Hemmung konnte von MARKUS und SILVERMAN (1968) bei 100 iE Penicillin G/ml nicht bestätigt werden. FRIEDMAN leitete aus den Ergebnissen ab, daß der Bakterienoberfläche die entscheidende Bedeutung bei der Enterotoxinbildung zukommt, da die oberflächenaktiven Substanzen und

Übersicht 2: Hemmung der Bildung von Enterotoxin B durch verschiedene Substanzen (nach FRIEDMAN, 1968)

Substanz	Konzentration (μ mol/ml)	Hemmung	
		S-6 %	243
Tween 80	24*	69	+
Ölsäure	1,42	62	100
Natriumdesoxycholat	0,386	48	93
Natriumlaurylsulfat	0,042	+	57
Penicillin G	0,039	100	-
Penicillin G	0,449	-	12
D-Cycloserin	0,274	100	86
Bacitracin	0,026	81	100

* mg/ml; + Steigerung

die Zellwandsynthese blockierenden Verbindungen auch die Enterotoxinbildung hemmten. Die Vermutung, daß Enterotoxin in der Bakterienwand gebildet wird, wurde auch dadurch gestützt, daß Penicillin, Cycloserin und Bacitracin die Produktion von α -Hämolyisin und Koagulase nicht blockierten und somit nicht allgemein gegen bakterielles Eiweiß wirken. Die von den letztgenannten Verbindungen ausgehenden Einflüsse sind jedoch nicht spezifisch auf die Enterotoxinbildung gerichtet, sondern vielmehr als Folge der allgemeinen Veränderung der Bakterienwandsynthese anzusehen.

Als Zeitpunkt der Bildung von Enterotoxin B im Verlauf der einzelnen Wachstumsphasen von *Staphylococcus aureus* geben die meisten Autoren Ende von logarithmischer und Anfang von stationärer Phase an. FRIEDMAN und WHITE (1965), die sich als erste mit dieser Frage beschäftigten, fanden in der frühen logarithmischen Phase nach 3 Stunden bei 37°C noch kein Enterotoxin in den Kulturfiltraten von *Staphylococcus aureus* S-6, nach weiteren 5 Stunden verlief der Nachweis jedoch positiv. Im darauffolgenden Jahr berichtete MARLAND (1966) davon, daß Enterotoxin erstmalig gefunden wurde, als der pH des Mediums, der während der lag-Phase von 5,8 auf 5,5 abgesunken war, anstieg. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch McLEAN, LILLY und ALFORD (1968), die nach 5 Stunden Bebrütung von *Staphylococcus aureus* 243 - am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und bei Zunahme des pH-Wertes des Mediums - erstmals Enterotoxin B nachwiesen. Da Enterotoxinproduktion und Staphylokokkenwachstum folglich nicht untrennbar miteinander verbunden angesehen wurden, vermuteten diese Autoren wie auch MARKUS (1969) sowie MARKUS und SILVERMAN (1970), daß Enterotoxin B - ähnlich vielen Antibiotika - ein sekundäres Stoffwechselprodukt ist. Auch MORSE, MAH und DOBROGOSZ (1969) gaben an, daß am meisten Enterotoxin gegen Ende der logarithmischen Phase gebildet wurde und die Enterotoxinsynthese vor Beginn der stationären Phase abgeschlossen war. METZGER et al. (1973) beobachteten andererseits bereits in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase Enterotoxinbildung und führten diesen Unterschied im Vergleich zu den anderen Autoren auf die Anwendung differierender Medien und unterschiedlicher Empfindlichkeit der Nachweismethoden zurück.

Sehr ausführlich haben sich MARKUS und SILVERMAN (1968, 1969 und 1970) mit den Faktoren beschäftigt, die auf die Enterotoxinbildung Einfluß nehmen können. Sie ermittelten, daß 95% des von

Staphylococcus aureus S-6 gebildeten Enterotoxin B gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase freigesetzt wurden (MARKUS und SILVERMAN, 1968 und 1969). Weitergehende Untersuchungen ergaben, daß Enterotoxin auch ohne gleichzeitiges Wachstum der Staphylokokken synthetisiert werden konnte. Da Staphylococcus aureus in einem stickstofffreien Medium aus K_2HPO_4 und Glucose in Gegenwart von Chloramphenicol Enterotoxin bilden konnte, gehen die Autoren davon aus, daß in den Bakterien der stationären Phase Toxin-Vorstufen vorhanden sind. Enterotoxinfreisetzung von gewaschenen Kulturen der stationären Wachstumsphase erfolgte jedoch nur, wenn aerobe Bedingungen (Schütteln) geschaffen wurden. Durch Atemgifte (2,4 - Dinitrophenol oder Natriumazid) wurde die Enterotoxinausscheidung sich nicht vermehrender Staphylokokken blockiert, nicht aber durch Stoffwechsel-hemmende Substanzen wie Chloramphenicol, Streptomycin oder $CoSO_4$, die nur bei wachsenden Kulturen von Staphylococcus aureus die Enterotoxinbildung hemmten (FRIEDMAN, 1966). Daraus wurde geschlossen, daß die Toxin-Vorstufe in Toxin umgewandelt werden kann, ohne daß eine Proteinsynthese notwendig ist.

Im Gegensatz zu Enterotoxin B, das wegen seines Erscheinens gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase der Staphylokokken von McLEAN, LILLY und ALFORD (1968), MARKUS (1969) sowie MARKUS und SILVERMAN (1970) als sekundäres Stoffwechselprodukt bezeichnet wurde, halten MARKUS und SILVERMAN (1970) Enterotoxin A für ein primäres Stoffwechselprodukt, von dem nur etwa 20% während der frühen stationären Phase gebildet wurden.

Keime, die während der logarithmischen Wachstumsphase (3,5 Std.) entnommen wurden, setzten relativ große Mengen an Enterotoxin A frei, während Keime der stationären Phase (16 Std.) kaum Enterotoxin produzierten. Chloramphenicol und 2,4-Dinitrophenol hemmten die Sekretion von Enterotoxin A, während Streptomycin

und Penicillin G ohne nachteilige Wirkung waren. Hieraus wurde von MARKUS und SILVERMAN (1970) geschlossen, daß es keine Enterotoxin-Vorstufe beim Typ A gibt. Im Gegensatz zur Bildung von Enterotoxin B wurde die Produktion von Enterotoxin A durch Änderung der kulturellen Bedingungen nur geringgradig beeinflußt.

2.3. Einfluß extrazellulärer Faktoren auf die Enterotoxinbildung

2.3.1. Züchtungsverfahren

Seitdem DACK et al. (1930) erstmals Enterotoxin in einer Kalbfleischbouillon produzierten, sind verschiedene Methoden und Medien zur Gewinnung von Enterotoxin beschrieben worden.

Früher fanden fast nur feste und halbfeste Medien Anwendung, jetzt werden auch flüssige Medien für diese Zwecke eingesetzt. Dabei hängt die Wahl des Mediums hinsichtlich seiner Konsistenz in erster Linie davon ab, zu welchem Zweck Enterotoxin produziert werden soll. Feste (HALLANDER, 1965; JARVIS und LAWRENCE, 1970; MINOR und MARTH, 1972) und halbfeste (BURNET, 1931; WOOLPERT und DACK, 1933; DOLMAN, 1934; DOLMAN und WILSON, 1938; CASMAN und BENNETT, 1963; BURBIANKA, 1969) Medien, die im Oberflächenverfahren mit der Staphylokokkenkultur beimpft werden und mit denen zumeist hohe Enterotoxinkonzentrationen /ml Nährboden erreicht werden, dienen vorwiegend zum Nachweis des Enterotoxinbildungsvermögens von Staphylokokkenstämmen (BERGDOLL, 1970). Flüssige Medien (mit Schüttel-, Fermenter- bzw. statischen Kulturen), mit denen aufgrund der größeren Nährbodenmengen insgesamt auch mehr Enterotoxin pro Ansatz - nicht aber pro ml - produziert wird (HALLANDER, 1965; JARVIS und LAWRENCE, 1970), werden andererseits vorgezogen, wenn Enterotoxin in größeren Mengen, z.B. zur Reindarstellung oder Antiserumgewinnung, benötigt wird. Allerdings finden flüssige Medien darüber hinaus sowohl bei dem von HEROLD, SCHULTZ und GERHARDT (1967) beschriebenen Dialyse-Kulturverfahren als auch bei der sog. "sac-culture"-Technik (CASMAN und BENNETT, 1963; DONNELLY et al., 1967; HOJVAT und JACKSON, 1969; SIMKOVIČOVA und GILBERT, 1971; UNTERMANN, 1972 b), bei denen Medium und Staphylokokken durch eine Dialysemembran getrennt sind und die Gewinnung besonders hoher Enterotoxinmengen/ml möglich ist, häufig Verwendung.

Im Rahmen dieser Arbeit, die sich mit der Produktion großer Enterotoxinmengen befaßt, soll auf die Verfahren, die zum Nachweis

der Enterotoxigenität empfohlen werden, nicht näher eingegangen werden. Angaben über deren in vergleichenden Untersuchungen ermittelte Eignung, finden sich u.a. bei CASMAN und BENNETT (1963), HALLANDER (1965), DONNELLY et al. (1967), JARVIS und LAWRENCE (1970), SIMKOVICOVA und GILBERT (1971) sowie UNTERMANN (1972 b).

2.3.2. Nährmedien

Während anfänglich nur natürliche Nährmedien eingesetzt wurden, wird die Wahl des zu verwendenden Mediums seit einigen Jahren zu einem großen Teil davon abhängig gemacht, zu welchem Zweck das Enterotoxin produziert werden soll. Wenn das Enterotoxin in möglichst reiner Form, z.B. im Hinblick auf eine Antiserumproduktion, erwünscht ist, empfiehlt sich ein möglichst einfaches Nährmedium, um die Reinigung nicht unnötig zu erschweren. Die Anwendung vollständig dialysierbarer Medien macht es heutzutage möglich, die Anwesenheit anderer Eiweiße, die z.T. schwer vom Enterotoxin abzutrennen sind, zu vermeiden (BERGDOLL, 1970). Falls die Untersuchung aber in erster Linie auf den Nachweis des Enterotoxinbildungsvermögens zielt, sollte ein Medium gewählt werden, das aufgrund seiner komplexen Zusammensetzung eine große Ausbeute ermöglicht (BERGDOLL, 1970).

Die ersten Medien, die zur Enterotoxingewinnung beschrieben wurden, wurden im allgemeinen aus Infusen von Kalbfleisch (DACK et al., 1930; WOOLPERT und DACK, 1933; SEGALOVE und DACK, 1941), Rindfleisch (DOLMAN, 1934) bzw. Rinderherz (BURNET, 1930; HALLANDER, 1965) hergestellt.

Heute kommt unter den nichtsynthetischen Nährböden dem von CASMAN und BENNETT (1963) empfohlenen Hirn-Herz-Medium die größte Bedeutung zu. Als Grundmedium für diverse Versuche verwendeten es u.a. D'ARCA SIMONETTI (1965), GENIGEORGIS und SADLER (1966), DONNELLY et al. (1967), McLEAN, LILLY und ALFORD (1968), HOJVAT und JACKSON (1969), REISER und WEISS (1969),

STARK und MIDDAGH (1970), GENIGEORGIS et al. (1971), SIMKOVICOVA und GILBERT (1971), TATINI et al. (1971), SCHEUSNER und HARMON (1971), SCHEUSNER (1972) sowie UNTERMANN (1972 a).

Über die Eignung dieses Mediums im Vergleich mit anderen Medien ist vereinzelt berichtet worden. So prüften CASMAN und BENNETT (1963) Hirn-Herz-Bouillon (pH 5,5) und Edamin S - ein pankreatisch verdautes Lactalbumin (Sheffield Farms) -, das in 2%iger Konzentration unter Zusatz von 0,2% Glucose, 0,4% NaH_2PO_4 , 0,000004% Thiaminhydrochlorid, 0,00012% Nicotinsäure und 0,00005% Calciumpantothenat (pH 5,8) verwendet wurde. Bei der Hälfte der untersuchten 28 Stämme wurde in Hirn-Herz-Bouillon mehr Enterotoxin produziert. Auch D'ARCA SIMONETTI (1965) erhielt bei Versuchen zur Herstellung von Enterotoxin B mit Hirn-Herz-Bouillon gleich gute oder bessere Ergebnisse als mit neun anderen Medien (BERGDOLL, 1972). REISER und WEISS (1969) testeten in ihren Versuchen die Eignung von Hirn-Herz-Bouillon der Firmen Difco und Scientific Fisher gegenüber Bouillon aus 4% NZ Amine NAK (Sheffield Chemical Co.) bzw. aus 3% NZ Amine NAK plus 3% Protein Hydrolysate Powder (Mead Johnson). Beide letztgenannten Medien enthielten außerdem noch 0,00005% Thiamin und 0,001% Nicotinsäure. Dabei stellten die Untersucher fest, daß in dem Produkt von Difco am wenigsten Enterotoxin gebildet wurde, das Produkt von Fisher den beiden anderen Medien aber kaum nachstand. Als Ursache für die z.T. erheblichen Unterschiede zwischen den beiden Hirn-Herz-Medien vermuteten die Autoren unterschiedliche "Pepton"-Komponenten der beiden Medien, da das Produkt von Fisher einfaches Pepton enthält, jenes von Difco Proteose-Pepton. Möglicherweise enthielt das weniger gut geeignete Produkt auch Substanzen, die die Enterotoxinbildung einschränkten, zumal MULLET und FRIEDMAN

(1961) bei Hirn-Herz-Medien mit einem hohen Gehalt an metallischen Ionen eine Hemmung der Enterotoxinproduktion feststellten.

JARVIS und LAWRENCE (1970) verglichen die Toxinausbeute dreier enterotoxinbildender Staphylokokkenstämme in Hirn-Herz-Medium (Difco) und einem Casein Hydrolysat Medium (CASMAN, 1958), dem 2% Trypticase zugefügt worden war. Die Untersucher kamen aufgrund ihrer Ergebnisse zu dem Schluß, daß beide Medien gleich gut geeignet sind. HALLANDER (1966) ermittelte demgegenüber eine deutliche Überlegenheit des von JARVIS und LAWRENCE (1970) verwendeten Casein Hydrolysat Mediums gegenüber Hirn-Herz-Medium (Difco). Auf dem erstgenannten Medium wurde etwa 30mal soviel Enterotoxin produziert.

Der Trend zu einfacheren Medien wurde von DOLMAN und WILSON (1938) eingeleitet. Das von diesen Autoren beschriebene Medium besteht aus 2% Proteose-Pepton; 0,5% NaCl; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,02% $MgSO_4$ und 0,01% $CaCl_2$ - pH 7,4. FAVORITE und HAMMON (1941) verwendeten ein Medium aus 1,5% Caseinhydrolysat; 0,25% Glucose; 0,00012% Nicotinsäure und 0,0000005% Thiaminchlorid - pH 7,6. Das Casein war säurehydrolysiert, die Konzentrationen an Nicotinsäure und Thiaminchlorid entsprechend den Empfehlungen von KNIGHT (1937 b), jene an Glucose entsprechend dem Vorschlag von GLADSTONE (1938) gewählt (FAVORITE und HAMMON, 1941). CASMAN (1958) erzielte mit diesem Medium jedoch nicht immer die gewünschten Enterotoxinausbeuten und empfahl daher folgende Modifizierung: 2% "Casamino acids"; 0,0028% Eisen-III-citrat; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,02% $MgSO_4$; 0,0025% Cystin; 0,7% Natriumacetat; 0,0075% Tryptophan; 0,00005% Calciumpantothenat; 0,000004% Thiaminiumhydrochlorid und 0,00012% Nicotinsäure - pH 7,2 bis 7,4.

SEGALOVE (1947) beschrieb dann als erster ein Medium zur Enterotoxingewinnung, dessen Hauptbestandteil 1% pankreatisch verdautes, vitamin- und carbohydratfreies Casein ("Amigen", Mead Johnson und Co., Evansville, Ind.) war. Außerdem enthielt dieses Medium 0,000005% Thiaminhydrochlorid, 0,00012% Nicotinsäure, 0,0001% Calciumpantothenat, 0,0014% $MgSO_4$, 0,45% KH_2PO_4 , 0,002% $FeSO_4(NH_4)_2SO_4$ und 0,25% Glucose - pH 7,6. In den folgenden Jahren wurden auch im Food Research Institute vorwiegend Medien benutzt, die als Hauptbestandteile "Amigen" enthielten (BERGDOLL, 1970). Anfänglich bestand das besonders häufig zur Anwendung kommende Medium aus 1,5% Amigen, 0,000123% Nicotinsäure, 0,000005% Thiamin und 0,225% Glucose - pH 7,6 (SURGALLA et al., 1951). Später wurden die Konzentrationen an Amigen (2%), Nicotinsäure (0,001%) und Thiamin (0,00005%) heraufgesetzt, auf den Zusatz von Glucose wurde jedoch verzichtet (SUGIYAMA, BERGDOLL und DACK, 1960; KATO et al., 1966; WU und BERGDOLL, 1971 a). Auch andere Untersucher verwendeten in der Folgezeit Amigen, das später unter dem Namen Protein Hydrolysate Powder (= PHP) in den Handel kam (MARLAND, 1968; FRIEDMAN, 1968 und 1969; MORSE, MAH und DOBRGOSZ, 1969; MORSE und BALDWIN, 1971; MORSE und MAH, 1973; VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI, 1973; u.a.). Der besondere Vorteil dieses Mediums liegt nach BERGDOLL (1970) darin, daß durch Gebrauch eines relativ einfachen Mediums Enterotoxin produziert werden kann, das sich verhältnismäßig leicht reinigen läßt.

Als Amigen (PHP) zeitweilig nicht zur Verfügung stand (BERGDOLL, 1970), wurden andere pankreatisch abgebaute Eiweißprodukte für die Enterotoxinproduktion eingesetzt. CASMAN und BENNETT (1963) verwendeten z.B. Edamin S (Sheffield Chemical Co., Norwich, N.Y.). Häufiger wurden die von der gleichen Firma hergestellten Produkte N-Z Amine A (BERGDOLL, 1962; CASMAN et al.,

1967; MARKUS und SILVERMAN, 1968, 1969 und 1970; DIETRICH, WATSON und SILVERMAN, 1972; METZGER et al., 1973; VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI, 1973; u.a.) und N-Z Amine NAK (KATO et al., 1966; REISER und WEISS, 1969; UNTERMANN, 1972 a; VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI, 1973; WOODBURN, MORITA und VENN, 1973; u.a.) als Hauptbestandteil der Medien für die Enterotoxinproduktion gewählt. In einigen Fällen wurden auch Kombinationen von N-Z Amine A und PHP (BERGDOLL, 1962; KATO et al., 1966; VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI, 1973; u.a.) bzw. von N-Z Amine NAK und PHP (KATO et al., 1966; REISER und WEISS, 1969; CZOP und BERGDOLL, 1970; TROLLER, 1971 und 1972; UNTERMANN, 1972 a; MILLER und FUNG, 1973; VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI, 1973; u.a.) verwendet.

Die Eignung der verschiedenen Eiweißabbauprodukte ist bisher nur von BERGDOLL (1962), KATO et al. (1966), REISER und WEISS (1969) sowie besonders ausführlich von VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI (1973) geprüft worden. BERGDOLL (1962) konnte mit 2% PHP 90 mcg/ml Enterotoxin nachweisen, mit der gleichen Menge N-Z Amine A nur 31 mcg/ml. Bei einer Kombination von 1% N-Z Amine A plus 1% PHP wurden jedoch 105 mcg/ml Enterotoxin gebildet. KATO et al. (1966) registrierten mit 2% PHP 200 mcg Enterotoxin B/ml, mit 2% N-Z Amine A 40 mcg/ml, mit 4% N-Z Amine A 110 mcg/ml. Bei einer Kombination von 1% PHP plus 1% N-Z Amine A wurden 190 mcg Enterotoxin B/ml gefunden, bei 3% N-Z Amine NAK plus 3% PHP sogar 480 mcg/ml. Für die Produktion der Enterotoxine A und C war jedoch ein Medium aus 4% N-Z Amine NAK besser als die Kombination aus 3% N-Z Amine NAK plus 3% PHP (KATO et al., 1966). REISER und WEISS (1969) berichteten demgegenüber beim Vergleich von 4%

N-Z Amine NAK und 3% N-Z Amine NAK plus 3% PHP, daß bei Bildnern von Enterotoxin B und C die Kombination im allgemeinen bessere Ergebnisse erbrachte. VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI (1973) prüften insgesamt 12 Proteinhydrolysate. Dabei wurde nur in 3% Edamine S (305 mcg/ml) mehr Enterotoxin B nachgewiesen als in 3% PHP. Mit den anderen Medien wurden zwischen 203 mcg/ml (N-Z Amine YT) und 64 mcg/ml (N-Z Amine E) produziert. Bei Verwendung von Kombinationen von 3% PHP mit 3% einem der anderen Proteinhydrolysate wurde mit Ausnahme der Medien mit N-Z Amine A (200 mcg/ml), Hy-Gase Amino (235 mcg/ml) bzw. N-Z Amine B (250 mcg/ml) jeweils mehr Enterotoxin gefunden als im 3%igen PHP-Medium. Dabei wurden bei insgesamt vier Kombinationen mehr als 400 mcg/ml registriert, und zwar bei N-Z Amine NAK plus PHP (554 mcg/ml), N-Z Amine E plus PHP (550 mcg/ml), Edamine S plus PHP (475 mcg/ml) und Soy peptone plus PHP (415 mcg/ml).

Von einigen Autoren wurde auch die Eignung von Medien aus chemisch definierten Substanzen geprüft (SURGALLA und HITE, 1946; SURGALLA, 1947; SULZER, 1964 zit. nach WU und BERGDOLL, 1971 a; PETERS, 1965; WU und BERGDOLL, 1971 b; MILLER und FUNG, 1973).

SURGALLA und HITE (1946) setzten drei verschiedene Medien ein, von denen eines 15 Aminosäuren enthielt - und damit bis auf das fehlende Prolin dem von GLADSTONE (1937) beschriebenen Medium ähnelte - , ein weiteres 6 und das letzte nur Arginin und Cystin. Außerdem war den drei Medien Magnesiumsulfat, Eisensulfat, Kaliumhydrogenphosphat, Glucose,

Nicotinsäure, Thiamin und Calciumpantothenat zugesetzt worden. Das Medium mit den zwei Aminosäuren erbrachte im Gegensatz zu den beiden anderen, vermutlich aufgrund zu geringen Stickstoffangebotes, im Affenfütterungstest keine positiven Ergebnisse; bei Zusatz von Ammoniumsulfat oder Glykokoll wurden allerdings bessere Resultate erzielt (SURGALLA und HITE, 1946). Bei späteren Untersuchungen (SURGALLA, 1947) wurden einerseits die von GLADSTONE (1937) getesteten 16 Aminosäuren eingesetzt, andererseits ein Medium mit 9 Aminosäuren (Alanin, Arginin, Cystin, Glykokoll, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Tryptophan und Valin). In beiden Medien konnte mit dem Affenfütterungstest die Bildung von Staphylokokkenenterotoxin nachgewiesen werden. Auch im Medium mit nur zwei Aminosäuren (Arginin und Cystin) konnte Enterotoxin, allerdings in sehr geringen Mengen, gefunden werden, wenn Ammoniumsulfat zugesetzt wurde. Günstiger war noch, wenn außer dem Ammoniumsulfat auch Glykokoll zugegeben wurde.

PETERS (1965) publizierte ähnliche Ergebnisse wie SURGALLA (1947). In einem synthetischen Medium aus Glucose, Ammoniumsulfat, anderen anorganischen Salzen sowie Vitaminen, waren die Aminosäuren Arginin und Cystin für das Wachstum von Staphylokokken unerläßlich. Der Zusatz von Ammoniumsulfat konnte durch Glykokoll ersetzt werden. Wenn das synthetische Medium keine Glucose enthielt, war die Anwesenheit von Arginin, Asparaginsäure, Cystin, Glykokoll, Valin, Prolin, Histidin und Phenylalanin erforderlich. In den Medien chemisch definierter Zusammensetzung wurde stets weniger Enterotoxin gebildet (5 mcg/ml) als in PHP (100 mcg/ml).

SULZER (1964) beschrieb ein Medium aus Arginin, Asparaginsäure, Glykokoll, Histidin, Phenylalanin, Prolin, Valin, Cystin,

Ammoniumsulfat, Natriumcitrat sowie anorganischen Salzen und Vitaminen, das nach WU und BERGDOLL (1971 a) ein geringes Wachstum und Enterotoxinbildung ermöglicht. WU und BERGDOLL (1971 b) prüften später ein Medium, das bis auf die Anzahl und Konzentration der Aminosäuren dem Medium von SULZER (1964) glich. Die Autoren stellten fest, daß dem quantitativen Verhältnis der Aminosäuren zueinander eine besondere Bedeutung für das maximale Wachstum der Staphylokokken zukommt und veränderten daher einige Male die Konzentration der 18 verwendeten Aminosäuren. Besonders wichtig erschien WU und BERGDOLL (1971 b) der Zusatz von Arginin, Serin und Threonin in größeren Mengen, da diese Aminosäuren schnell abgebaut wurden. Dabei schien das Arginin essentiell für die Enterotoxinbildung zu sein, da bei Anwesenheit dieser Aminosäure, im Gegensatz zu Serin und Threonin, weiterhin Enterotoxin produziert wurde. Weitere Veränderungen im Verhältnis der Aminosäuren sind nach Ansicht der Autoren noch nötig, da weniger Enterotoxin gebildet wurde als in PHP oder dem synthetischen Medium mit Zusatz von PHP. MILLER und FUNG (1973) berichteten demgegenüber, daß nach 72stündiger Bebrütung der Unterschied in der Enterotoxinproduktion (240 mcg/ml) gegenüber der Kombination PHP/N-Z Amine NAK (300 mcg/ml) nicht sehr erheblich war.

MAH, FUNG und MORSE (1967) stellten zuerst ein Medium zusammen, das aus 18 in PHP enthaltenen Aminosäuren bestand. Um dabei zwischen den für das Wachstum und die Bildung von Enterotoxin B essentiellen und nicht essentiellen Aminosäuren unterscheiden zu können, ließen sie anschließend verschiedene Aminosäuren weg. MAH, FUNG und MORSE (1967) kamen dabei zu einem Medium, das aus 11 Aminosäuren (Glykokoll, Valin,

Leucin, Threonin, Phenylalanin, Tyrosin, Cystin, Methionin, Prolin, Arginin und Histidin) sowie anorganischen Salzen und Vitaminen bestand, konnten aber mit diesem Medium nicht so gute Enterotoxinausbeuten erzielen (5 - 10 mcg/ml) wie mit 0,5% PHP (72 mcg/ml), obwohl das Wachstum der Staphylokokken gleich gut war. Auch mit der Kombination PHP/N-Z Amine NAK wurde mehr Enterotoxin produziert als in dem Medium mit 18 bzw. 11 Aminosäuren (MILLER und FUNG, 1973). Die letztgenannten Autoren führten die Untersuchungen weiter und kamen zu dem Ergebnis, daß ein synthetisches Medium aus Natriumglutamat, Arginin, Cystin und Phenylalanin, sechs anorganischen Salzen und Vitaminen noch eine Produktion von 5 - 6 mcg/ml Enterotoxin ermöglicht. Bei den Versuchen zeigte sich, daß mit Abnahme der Zahl der Aminosäuren - ausgehend von den 11 von MAH, FUNG und MORSE (1967) verwendeten Aminosäuren - stets weniger Enterotoxin gebildet wurde. Wenn nur noch Arginin und Phenylalanin im Medium vorhanden waren, wurde innerhalb von 72 Stunden kein Enterotoxin nachgewiesen, das Wachstum der Staphylokokken war stark eingeschränkt. MILLER und FUNG (1973) sind auch aufgrund anderer Ergebnisse der Ansicht, daß die Konzentration der Aminosäuren weniger bedeutsam für die Enterotoxinbildung ist als das Fehlen einzelner Aminosäuren.

DRYE und MAH (1969) stellten fest, daß die stärkere Enterotoxinbildung von Staphylococcus aureus S-6 in PHP im Vergleich zu definierten Medien durch eine dialysierbare Komponente bedingt ist. Versuche zeigten, daß durch Zusatz von Äthyläther-, Benzol- bzw. Azeton-Extrakten von PHP zum synthetischen Medium die Enterotoxinausbeute insofern gesteigert wurde, als die totale Proteinsynthese abnahm. Bei Methanolextrakten von PHP wurde auch eine Stimulierung der Enterotoxinsynthese beobachtet.

WU und BERGDOLL (1971 a) konnten durch säulenchromatographische Trennung mittels Dowex 50-X2 18 verschiedene Fraktionen aus PHP gewinnen. Die Fraktionen I, J, K, O, R stimulierten die Enterotoxinproduktion stärker als eine gleiche Menge PHP. Weitergehende Untersuchungen zeigten, daß nicht die freien Aminosäuren der fünf isolierten Fraktionen für die Steigerung der Enterotoxinbildung verantwortlich waren, sondern Peptide eine entscheidende Rolle spielten. Die Autoren kamen aufgrund ihrer Untersuchungen zu dem Schluß, daß Prolin in Peptidform an der Enterotoxinbildung beteiligt ist und der Primärstruktur der Peptide die entscheidende Bedeutung zukommt. Allerdings scheinen auch andere Aminosäuren in Peptidform die Enterotoxinproduktion zu stimulieren. Auch MARKUS (1969) hatte berichtet, daß die aus N-Z Amine A isolierten Aminosäuren die Bildung von Enterotoxin B nicht steigern konnten und auch die Mg^{++} , Fe^{++} , Ca^{++} oder K^{+} -Ionen ohne Einfluß auf die Enterotoxinsynthese waren. Entscheidende Einflußnahme auf die Enterotoxinproduktion wurde von MARKUS (1969) ebenfalls spezifischen Peptiden zugeschrieben.

Abgesehen von den komplexen Medien wie z.B. Hirn-Herz-Medium, sind für optimale Vermehrung der Staphylokokken und Bildung von Enterotoxin Zusätze zu den Medien erforderlich, speziell bei den Proteinhydrolysaten. Besondere Bedeutung kommt dabei Vitaminen zu.

KNIGHT (1937 a und b) fand, daß der für das Wachstum von *Staphyloboccus aureus* essentielle Faktor, der zuvor mit Hefe- oder Fleischextrakt in das Medium gelangte, durch Thiamin und Nicotinsäure ersetzt werden konnte. Er empfahl daher den Zusatz von 10^{-5} Mol Nicotinsäure (0,000123%) nach SURGALLA (1947) und von 10^{-7} Mol Thiamin (0,00000334% nach SURGALLA, 1947).

PORTER und PELCZAR (1940) berichteten, daß einige der von ihnen getesteten Staphylokokkenstämme nur bei Zusatz von Biotin wuchsen. Als optimale Konzentration wurde 0,00001% angegeben, mit 0,00002% Biotin wurden keine deutlich besseren Ergebnisse registriert. MAH, FUNG und MORSE (1967) beobachteten, daß Biotin für das Wachstum von Staphylococcus aureus S-6 in einem chemisch definierten Medium notwendig war, wenn Glutaminsäure und Glucose als C-Quelle genutzt wurden. SURGALLA (1947) konnte diese Ergebnisse bei seinen Versuchen nicht bestätigen, da das Wachstum nur in einigen Fällen geringgradig verbessert wurde.

Während PORTER und PELCZAR (1940) keinen stimulierenden Effekt von Pantothensäure feststellen konnten, wiesen SEVAG und GREEN (1944) auf den positiven Einfluß dieses Vitamins für das Wachstum von Staphylococcus aureus in Tryptophan-freien Medien bei Anwesenheit von Glucose hin. Die Autoren schlossen aus ihren Beobachtungen, daß Pantothensäure in den Glucoseabbau eingreift und die Bildung des für das Wachstum der Staphylokokken wichtigen Tryptophans ermöglicht. SURGALLA (1947) kam bei seinen Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß das Wachstum und Enterotoxinbildungsvermögen der Staphylokokken durch 0,0001% Calcium-pantothenat gesteigert wurde.

In der Folgezeit wurden den zur Enterotoxinproduktion eingesetzten Medien die aufgeführten Vitamine in recht unterschiedlicher Konzentration und Kombination zugesetzt. Von BERGDOLL und Mitarbeitern (SUGIYAMA, BERGDOLL und DACK, 1960; BERGDOLL, 1962; KATO et al., 1966; REISER und WEISS, 1969; WU und BERGDOLL, 1971; u.a.), FRIEDMAN (1966 und 1968), TROLLER (1971 und 1972), von MORSE und Mitarbeitern (MORSE und BALDWIN, 1971; MORSE und MAH, 1973) sowie WOODBURN, MORITA und VENN (1973)

wurden Thiamin (0,0000033% bis 0,005%) und Nicotinsäure (0,00012% bis 0,001%) verwendet. CASMAN und BENNETT (1963), FREA, McCOY und STRONG (1963), MORSE, MAH und DOBROGOSZ (1969) sowie UNTERMANN (1972 a) setzten Thiamin, Nicotinsäure sowie Calciumpantothenat (0,0000001% bis 0,0002%) zu. MAH, FUNG und MORSE (1967) wählten Thiamin, Nicotinsäure und 0,0000003% Biotin, MILLER und FUNG (1973) sowie VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI (1973) Thiamin, Nicotinsäure, Calciumpantothenat und Biotin. Nach BERGDOLL (1970) ist der Zusatz anderer Vitamine als Thiamin und Nicotinsäure nicht notwendig, zumal auch mit Nicotinsäure allein beinahe genausoviel Enterotoxin B gebildet wird (210 mcg/ml) wie mit Nicotinsäure plus Thiamin (245 mcg/ml). Mit Thiamin allein wurden demgegenüber nur 15 mcg Enterotoxin/ml produziert.

Einige Autoren gaben zusätzlich (FREA, McCOY und STRONG, 1963) oder anstelle von Vitaminen (ROSENWALD und LINCOLN, 1966; MARKUS und SILVERMAN, 1968, 1969 und 1970; FRIEDMAN und HOWARD, 1971; METZGER et al., 1973; u.a.) Hefeextrakt in die Medien.

HAYNES, KUEHNE und RHODES (1954) zeigten, daß Medien mit 0,04% K_2HPO_4 nicht genügen, um *Staphylococcus aureus* mit ausreichend K^+ zu versorgen. Allerdings war ein zu hoher Gehalt an Kalium nach Angaben obiger Autoren auch ungünstig für das Wachstum von Staphylokokken, obwohl die Keime gegenüber einem geringen Überschuß an K^+ relativ resistent sind. FRIEDMAN (1966) beobachtete Entsprechendes hinsichtlich der Bildung von Enterotoxin B. Während in PHP ohne K_2HPO_4 45 mcg Enterotoxin produziert wurden, war bei Zusatz von 36,74 μ mol K_2HPO_4 /ml kein Enterotoxin mehr nachweisbar. Die genaue Wirkung des Kaliums konnte bisher nicht ermittelt werden. Es handelt sich jedoch nicht um eine Pufferwirkung, da der nachteilige Effekt von Glucose auf das Keimwachstum zwar durch den Zusatz von Kaliumphosphat neutralisiert werden

konnte, nicht aber durch Zugabe entsprechender Mengen von Natriumphosphat.

Auf den günstigen Effekt von 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat auf die Bildung von Enterotoxin B hat BERGDOLL (1962) bei Verwendung von N-Z Amine A verwiesen. Auf diese Weise konnten mit dem derartig substituierten 3%igen N-Z Amine A 124 mcg Enterotoxin/ml produziert werden (mehr als mit PHP - 90 mcg/ml), ohne K_2HPO_4 waren es nur 58 mcg/ml. KATO et al. (1966) registrierterähnliche Ergebnisse bei Verwendung des gleichen Mediums. MARKUS (1969) beobachtete demgegenüber keinen positiven Effekt von K^+ bei Verwendung von N-Z Amine A. Dennoch kann nach BERGDOLL (1970) angenommen werden, daß N-Z Amine A nicht soviel K^+ enthält, wie für das optimale Wachstum von Staphylococcus aureus erforderlich ist.

Über die Eignung von Glucose als Zusatz zu den Medien im Hinblick auf eine bessere Enterotoxinbildung bestehen unterschiedliche Ansichten. Vor der Entwicklung serologischer Nachweisverfahren wurde den Medien häufig Glucose zugesetzt (z.B. FAVORITE und HAMMON, 1941; SURGALLA und HITE, 1946; SEGALOVE, 1947; SURGALLA, 1947; SURGALLA et al., 1951), später nur noch selten (CASMAN und BENNETT, 1963; MAH, FUNG und MORSE, 1967; METZGER et al., 1973; u.a.). PETERS (1965) berichtete, daß der Zusatz von 0,1 bis 5,0% Glucose in einem synthetischen, aus sechs Aminosäuren bestehenden Medium optimal war, mit weiter zunehmender Glucosekonzentration aber eine allmähliche Wachstumshemmung auftrat. Ab 30% Glucose war kein Staphylokokkenwachstum mehr zu beobachten, während ab 20% Glucose das Wachstum zwar noch gut war, aber nur wenig Enterotoxin gebildet wurde. Bedingt wurde der hemmende Effekt hoher Glucosekonzentrationen nach PETERS (1965) durch die Säurebildung und damit verbundene pH-Wert-Senkung. MORSE, MAH und DOBROGOSZ (1969) registrierten, daß in Anwesenheit von 0,25% Glucose nach

12stündiger Inkubation kein Enterotoxin nachzuweisen war, nach 24 Std. aber kein deutlicher Unterschied in der Enterotoxinbildung (112 mcg/ml) gegenüber dem glucosefreien 1%igen PHP-Medium (115 mcg/ml) gegeben war. Wenig oder kein Enterotoxin ergaben Medien, die 0,35% oder mehr Glucose enthielten. Der pH-Wert des glucosefreien Mediums stieg innerhalb von 24 Std. von 5,6 über 8,2 (12 Std.) auf 8,6, derjenige des Mediums mit 0,35% Glucose fiel auf 4,7 (12 Std.), um dann wieder leicht anzusteigen (pH 5,0). Bei den Medien mit weniger als 0,35% Glucose stiegen pH-Wert und Enterotoxinertrag nach dem Glucoseabbau, der sich nach 12 - 24 Std. vollzogen hatte, deutlich an. Durch manuelle Einstellung der H^+ -Ionenkonzentration auf einen alkalischen Bereich konnte die in glucosehaltigen Medien verzögerte Enterotoxinbildung beschleunigt werden. Aus diesem Verhalten folgerten die Autoren, daß es bei hohen Glucosekonzentrationen infolge Ansammlung von Endprodukten aus dem Glucosestoffwechsel zur Hemmung der Enterotoxinsynthese kommt. Bei pH-Werten von etwa 5,0 wurde kein oder nur wenig Enterotoxin produziert.

MORSE und BALDWIN (1971) stellten später bei der Prüfung der nicht gasförmigen Endprodukte des Glucosestoffwechsels fest, daß die Enterotoxinsynthese unter Bedingungen, die die oxydative Decarboxylierung des aus der Glucose entstandenen Pyruvats begünstigen, herabgesetzt ist. Weiterführende Experimente, die auf den Erkenntnissen von MORSE und BALDWIN (1971) aufbauten, wurden von MORSE und MAH (1973) durchgeführt. Die Autoren griffen die Tatsache auf, daß durch Hemmung der oxydativen Decarboxylierung des Pyruvats die Repression der Toxinsynthese durch Glucose verhindert oder zumindest gemildert wird. So wurde z.B. mit Hilfe eines anaeroben Schocks, der die Decarboxylierung verzögerte, die Enterotoxinrate soweit gesteigert, daß immerhin ca. 60% der Toxinmenge, die in Abwesenheit von Glucose gebildet wurde, gewonnen werden konnten. Auch durch Zusatz von Nitrat, das als Elektronenakzeptor für Sauerstoff diente, wurde die Enterotoxinsynthese unter anaeroben Bedingungen begünstigt, zumal Pyruvat nicht nachweisbar war. METZGER

et al. (1973), die einem Medium aus 4% N-Z Amine A O, 2% Dextrose zusetzten, fanden im Gegensatz zu MORSE und Mitarbeitern nur einen kurzen Abfall des pH-Wertes auf 5,8 (nach 195 Min.), bevor der pH-Wert schnell wieder anstieg. Die Bildung von Enterotoxin B wurde durch den Dextrosezusatz nach Ansicht der Autoren vermutlich nicht beeinflusst, da weniger der Dextrose als dem pH-Wert Bedeutung zukommt und dieser aufgrund des relativ hohen Gehaltes an Proteinhydrolysaten nicht allzu stark absank. MILLER und FUNG (1973) verglichen die Wirkung von Glucosezusatz in komplexen (3% PHP und 3% N-Z Amine NAK) und chemisch definierten Medien. Dabei war die Abnahme des Enterotoxingehaltes im komplexen Medium mit 1% Glucose sehr viel stärker ausgeprägt (Rückgang von 300 auf 60 mcg Enterotoxin/ml) als in einem aus 18 Aminosäuren und Natriumglutamat sowie 1% Glucose bestehenden Medium (Rückgang von 37 auf 30 mcg Enterotoxin/ml). Mit Abnahme der Zahl der Aminosäuren im glutamathaltigen, chemisch definierten Medium, wurde der hemmende Effekt der Glucose immer geringer, z.T. wurde sogar ein leichter Anstieg in der Enterotoxinausbeute beobachtet. Für den unterschiedlichen Effekt der Glucose in komplexen und chemisch definierten Medien sehen die Autoren zwei Möglichkeiten: Die Wirkung der Glucose ist in chemisch definierten Medien entweder anders als in komplexen Medien oder biosynthetische intermediäre Produkte des Glucosestoffwechsels unterdrücken die Enterotoxin B-Bildung erst ab einem bestimmten Aminosäuren- oder Stickstoffgehalt. Möglicherweise dienen diese intermediären Produkte in nährstoffarmen Medien sogar als Energiequelle für *Staphylococcus aureus*.

2.3.3. Bebrütungstemperatur

Im allgemeinen wird die Bebrütung der Kulturmedien zur Gewinnung von Staphylokokkenenterotoxinen bei 35°C - 37°C durchgeführt (BERGDOLL, 1970; BAIRD-PARKER, 1971). Experimente am Food Research Institute of the University of Wisconsin zeigten, daß Enterotoxin zwar auch bei 25°C und 30°C gebildet wird, die Mengen jedoch erheblich geringer sind als bei 37°C (BERGDOLL, 1970). Schon SEGALOVE und DACK (1941) hatten nachgewiesen, daß nach 4 Wochen Bebrütung bei 4° - $6,7^{\circ}\text{C}$, 7 Tagen bei 9°C bzw. 3 Tagen bei 15°C kein Enterotoxin im Affenfütterungstest nachweisbar war. Positiv verlief der Affenfütterungstest, wenn das mit Staphylokokken beimpfte Kalbfleischmedium 3 Tage bei 18°C bzw. 20° - $23,5^{\circ}\text{C}$ oder 12 Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch McLEAN, LILLY und ALFORD (1968), die einen Enterotoxin B-bildenden Stamm bei 16°C , 20°C bzw. 37°C in einem Hirn-Herz-Medium bebrüteten. Nach 112 Stunden war bei allen drei Temperaturen zwar annähernd die gleiche optische Dichte zu registrieren, der Enterotoxingehalt nahm jedoch von 340 mcg/ml (37°C) über 20 mcg/ml (20°C) auf 8 mcg/ml (16°C) ab. HOJVAT und JACKSON (1969) bebrüteten einen Enterotoxin B-produzierenden Staphylokokkenstamm in Hirn-Herz-Medium bei 4°C , 15°C , 20°C , 25°C , 30°C bzw. 35°C . Bei 4°C waren weder Keimwachstum noch Enterotoxinbildung festzustellen, bei 35°C wurden jeweils die höchsten Werte registriert.

MARLAND (1966) berichtete, daß Staphylokokkenwachstum und Enterotoxin B-Bildung von $15,2^{\circ}\text{C}$ - $43,2^{\circ}\text{C}$ möglich sind, in den Extrembereichen jedoch bei noch deutlicher Keimvermehrung nur geringe Mengen Enterotoxin nachweisbar sind. Bei einer Bebrütungstemperatur von $15,2^{\circ}\text{C}$ waren z.B. nach fünf Tagen erst 2 mcg Enterotoxin/ml gebildet, während bei 37°C innerhalb von 24 Stunden 260 mcg Enterotoxin/ml produziert wurden. SCHEUSNER

und HARMON (1971) ermittelten, daß die Produktion von Enterotoxin A, B, C bzw. D durch Temperaturen unter 20°C bzw. über 46°C erheblich verzögert oder total gehemmt wird. Aus einer späteren Publikation (SCHEUSNER, 1972) geht hervor, daß von vier Enterotoxinbildnern, die bei Temperaturen zwischen 7°C und 50°C inkubiert wurden, keiner bei 7°C und 50°C wuchs oder Enterotoxin produzierte. Bei 13°C kam es zwar bei allen vier Stämmen bereits zur Keimvermehrung, jedoch nur bei einem zur Enterotoxinbildung. Bei allen vier Stämmen wurde innerhalb des Temperaturspektrums von 19°C - 39°C neben Bakterienwachstum auch Enterotoxinbildung nachgewiesen, bei drei der untersuchten Stämme sogar bis 45°C.

DIETRICH, WATSON und SILVERMAN (1972) konnten bei Bebrütung bei 45°C weder Wachstum noch Enterotoxinproduktion feststellen. Durch Inkubation bei 40°C erhielten sie 120 mcg Enterotoxin/ml, während bei 37°C 320 mcg Toxin/ml gebildet wurden. Auch bei den anderen geprüften Temperaturen (20°C - 35°C) wurde weniger Enterotoxin gefunden als bei 37°C. Im Gegensatz zum End-pH, der ebenso wie die Enterotoxinmenge mit zunehmender Temperatur bis auf 37°C fortlaufend anstieg, war bei der Keimdichte ein ähnlich progressiver Anstieg nicht zu verzeichnen.

TATINI et al. (1971) sowie VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI (1973) berichteten im Gegensatz zu BAIRD-PARKER (1971) sowie DIETRICH, WATSON und SILVERMAN (1972), daß Temperaturen über 37°C, und zwar 40°C bzw. 45°C für die Enterotoxinproduktion günstiger seien. Nach Angaben von TATINI et al. (1971) traf das insbesondere auf einen Enterotoxin C-bildenden Stamm zu. VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI (1973), die das Verhalten von je einem Enterotoxin B- bzw. C-produzierenden Stamm prüften, erzielten nach 24- bzw. 48ständiger Inkubation die höchsten Toxinmengen (Typ B

bzw. C) bei einer Temperatur von 40°C. Nach 48 Stunden war zwar bei allen geprüften Temperaturen - außer bei 10°C und bei 50°C - Toxin nachweisbar, doch wurden im Vergleich zur Inkubation bei 40°C bei Temperaturen von 30°C, 35°C, 37°C bzw. 42°C ca. 20 - 40% weniger Enterotoxin gebildet, bei 15°C, 20°C, 25°C, 44°C bzw. 45°C sogar 80 - 95% weniger. Der Unterschied in den Toxinmengen bei Bebrütungstemperaturen von 37°C bzw. 40°C ließ sich statistisch absichern. Außerdem waren sowohl Enterotoxin B als auch Enterotoxin C aufgrund verkürzter lag-Phase bei einer Bebrütung bei 40°C früher im Medium nachweisbar.

2.3.4. pH-Wert

Anfänglich wurde dem Einfluß des pH-Wertes von Medien auf die Enterotoxinbildung weniger Bedeutung beigemessen, zumal keine objektiven Methoden zur Bestimmung des Enterotoxingehaltes zur Verfügung standen und - wie sich später (BERGDOLL, 1962) herausstellte - Enterotoxin in Medien mit einem Anfangs-pH von 5 - 8 produziert werden kann. WOOLPERT und DACK (1933) stellten ihr Kalbfleischmedium auf pH 6,0 ein, DOLMAN (1934) wählte für das von ihm verwendete Rindfleischmedium pH 7,2. FAVORITE und HAMMON (1941) setzten das von ihnen entwickelte Medium mit einem pH-Wert von 7,6 ein. Auch im Food Research Institute (SURGALLA und HITE, 1946; SURGALLA, 1947; SURGALLA et al., 1951) wurden die Medien über einige Zeit auf diesen pH-Wert eingestellt, während CASMAN (1958) pH-Werte im Bereich von 7,2 bis 7,4 bevorzugte.

Erste vergleichende Untersuchungen über den Einfluß des pH-Wertes auf die Bildung von Enterotoxin B beschrieb BERGDOLL (1970). Die beste Ausbeute wurde beim Anfangs-pH von 6,0 erzielt (290 mcg/ml), allerdings wurden bei pH 5,5, 6,5 bzw. 7,0 nur etwas geringere Mengen (260 - 270 mcg/ml) produziert. Vergleichsweise gering war der Enterotoxingehalt der auf 5,0 bzw. 8,0 eingestellten Medien (200 mcg/ml). Während KATO et al. (1966) über eine maximale Produktion von Enterotoxin B bei Einstellung des Mediums auf pH 6,0 bis 7,0 berichteten, gaben REISER und WEISS (1969) als optimalen pH-Wert 6,8 an. MARKUS und SILVERMAN (1969) wiesen auf die Bedeutung hin, die der Zusammensetzung des Mediums bei Beurteilung des pH-Wert-Einflusses auf die Enterotoxinbildung zukommt. So wurde in einem Medium aus 4% N-Z Amine A plus O, 1% K_2HPO_4 bei einem Anfangs-pH von 7,0 bis 7,5 am meisten Enterotoxin gebildet, in einem nährstoffärmeren Medium (Glucose plus K_2HPO_4) dagegen am meisten bei einem Anfangs-pH von 8,0 bis 8,5.

Nach BARBER und DEIBEL (1972) ist darüber hinaus zu berücksichtigen, daß unter aeroben Verhältnissen in leicht sauren Medien eher Enterotoxin produziert wurde als unter anaeroben Verhältnissen. So bildeten die meisten Stämme bei aerober Bebrütung noch bei pH 5,1 Enterotoxin, während bei anaerober Inkubation nur in Ausnahmefällen bei pH-Werten unter 5,7 Enterotoxin nachzuweisen war.

MARLAND (1966) berichtete, daß in 2% PHP, dessen pH-Wert belassen (5,8) und während der Bebrütung nicht kontrolliert wurde, mehr Enterotoxin gebildet wurde als im gleichen Medium, das vor der Inkubation auf pH 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 oder 9,0 eingestellt und durch Zugabe von Puffer oder Titration auf dem jeweiligen pH-Wert gehalten wurde. Bei den Medien mit dem Anfangs-pH von 5,0 bzw. 9,0 wurde überhaupt kein Enterotoxin nachgewiesen. METZGER et al. (1973) konnten demgegenüber zeigen, daß in einem Medium aus 4% N-Z Amine A plus Hefeextrakt und Glucose bei Einstellung auf pH 7,0 und Konstanzhaltung in 10 Stunden mehr Enterotoxin produziert wurde (578 mcg/ml) als in den Medien, deren pH-verlauf nicht kontrolliert wurde (440 mcg/ml). In den auf pH 6,0 bzw. 8,0 eingestellten Medien wurden bei Konstanzhaltung des Wertes nur 268 mcg/ml (pH 6,0) bzw. 32 mcg/ml (pH 8,0) registriert.

Auch die Bildung von Enterotoxin C scheint relativ pH-abhängig zu sein. So erzielten REISER und WEISS (1969) mit verschiedenen Medien bei einem Ausgangs-pH von 6,8 erheblich höhere Ausbeuten als bei pH 6,0 oder pH 5,3. Andererseits berichteten GENIGEORGIS et al. (1971) von Enterotoxinproduktion im Bereich von pH 4,0 bis pH 9,83 (bei Beimpfung mit mehr als 10^8 Keimen/ml und 8 Tagen Bebrütung bei 37°C), wobei die höchsten Mengen/ml bei pH 5,5 - 6,0 nachgewiesen wurden.

Die Produktion von Enterotoxin A scheint weniger pH-abhängig zu sein als jene von Enterotoxin B und C (REISER und WEISS, 1969). Schon CASMAN und BENNETT (1963) hatten die beste Enterotoxinausbeute (Typ A) in Hirn-Herz-Bouillon gehabt, die auf pH 5,5 eingestellt wurde. Im Medium aus Edamine S war der optimale pH-Wert 5,8, während beim halbfesten Hirn-Herz-Medium pH 5,3 vorzuziehen war. KATO et al. (1966) fanden bei Verwendung von 3% PHP und 3% N-Z Amine NAK trotz eines Maximums bei pH 6,0 bis 7,0 keine großen Unterschiede im Bereich von pH 5,0 bis 8,0 (2,9 bis 4,2 mcg/ml), bekamen aber mit 4% NAK maximale Erträge bei pH 6,0 bis 6,5. REISER und WEISS (1969), die für die Bildung von Enterotoxin B und C pH 6,8 als optimalen Wert im Vergleich zu pH 6,0 und pH 5,3 bezeichneten, fanden bei Produzenten von Enterotoxin A bei pH 5,3 durchwegs keine geringeren Enterotoxinmengen als bei pH 6,8 oder pH 6,0.

2.3.5. Sauerstoffspannung

In den Anfängen der Enterotoxinforschung wurden die Kulturmedien nur unter verschiedenen atmosphärischen Bedingungen bebrütet. Später ist zur Steigerung der Enterotoxinproduktion von verschiedenen Autoren (MARLAND, 1966; McLEAN, LILLY und ALFORD, 1968; MARKUS und SILVERMAN, 1968, 1969; BARBER und DEIBEL, 1972) eine Belüftung der flüssigen Medien empfohlen worden. Zu diesem Zweck können Luft oder reiner Sauerstoff während der Bebrütung kontinuierlich in die Medien eingeleitet werden bzw. die Gefäße mit dem Medium in unterschiedlicher Art und Weise bewegt (z.B. gedreht, geschüttelt) werden. Dabei kommt es nicht nur auf die Geschwindigkeit der Bewegung an, sondern u.a. auch auf die Größe des Gefäßes in Bezug zur Menge des Mediums und die Art des Gefäßverschlusses. Diese Faktoren beeinflussen ebenfalls die Sauerstoffübertragung (DIETRICH, WATSON und SILVERMAN, 1972).

WOOLPERT und DACK (1933) ersetzten aufgrund der Angaben von BURNET (1930) zu Beginn der Inkubation 20 - 25% der Luft durch CO_2 , DOLMAN (1934) sowie DOLMAN und WILSON (1938) inkubierten ihre halbfesten Medien in Behältern mit 30 - 40% CO_2 und 60 - 70% O_2 . FAVORITE und HAMMON (1941), die als Kriterium für den Enterotoxingehalt den Hämolytintiter heranzogen, untersuchten den Einfluß folgender Gaszusammensetzungen: 25% CO_2 + 70% O_2 + 5% Luft; 50% CO_2 + 45% O_2 + 5% Luft bzw. 25% CO_2 + 75% Luft. Dabei erhielten sie bei den beiden letztgenannten Gasgemischen die besten Ergebnisse. SURGALLA (1947) bebrütete die von ihm zur Enterotoxingewinnung verwendeten Medien nach Zufuhr von 20% CO_2 . Außerdem wurden die Medien in der Stunde zwischen 30 und 300mal hin und her bewegt.

SURGALLA et al. (1951) beschrieben drei verschiedene Möglichkeiten zur Enterotoxinherstellung. Einmal bebrüteten sie das flüssige Medium in Mengen von 200 ml in Roux-Flaschen in einem Brutschrank, nachdem sie zuvor ca. 20% der Luft durch CO_2 ersetzt hatten. Bei Verwendung größerer Mengen Mediums (10 Liter) führten sie die Inkubation in 12 Gallonen fassenden Glasgefäßen so durch, daß vor Verschuß 20% der Luft durch CO_2 ersetzt wurden und die Gefäße außerdem stündlich dreimal gedreht wurden. Schließlich verwendeten sie 5 Gallonen-Gefäße, in die 15 Liter Medium verbracht wurden, die nach Verschuß während der gesamten Inkubationszeit in Anlehnung an CASMAN (1938; , 1940 a, b) sowie ACHORN und SCHWAB (1948) kontinuierlich belüftet wurden (ca. 30 Liter in der Stunde). Dieses Verfahren wurde später erfolgreich zur Produktion der Enterotoxine A, B bzw. C verwendet (BERGDOLL, 1970).

MARLAND (1966) stellte als erster eingehende Untersuchungen über den Effekt der Luft-, Sauerstoff- bzw. CO_2 -Zufuhr bei Verwendung eines Fermenters zur Enterotoxinproduktion an. Starke Luftzufuhr (1200 cc/min/500 ml Kultur) bewirkte ein relativ gutes Keimwachstum, erbrachte jedoch eine geringe Enterotoxinausbeute (8 - 24 mcg/ml nach 24 Std.) im Vergleich zu Schüttelkulturen (260 mcg/ml). Bei geringerer Luftzufuhr (20 cc/min/500 ml) wurden besseres Wachstum der Keime und höhere Enterotoxinausbeuten (320 mcg/ml) registriert. Unter anaeroben Verhältnissen fand keine Toxinbildung mehr statt, obwohl sich die Staphylokokken ziemlich gut vermehrten. Zugabe von reinem Sauerstoff (20 cc/min/500 ml) beeinflusste zwar die Wachstumsrate der Staphylokokken positiv, erbrachte aber keinen Vorteil hinsichtlich des Enterotoxingewinns verglichen mit der Luftzufuhr gleicher Menge. Zufuhr einer Mischung aus 20% CO_2 und 80% O_2 (20 cc/min/500 ml) führte zu einem weiteren Anstieg

des Keimwachstums, senkte aber den Gehalt an Enterotoxin auf 160 mcg Enterotoxin B/ml in der 24stündigen Kultur. Bei diesen Versuchen stellte MARLAND auch fest, daß selbst bei Zufuhr von 200 cc reinem Sauerstoff/min/500 ml Kultur die bei der Beimpfung bestehende 100%ige Sättigung des Mediums mit gelöstem Sauerstoff während der späten logarithmischen und frühen stationären Phase auf 0% abfiel. Erst als die Keimvermehrung ihr Maximum erreicht hatte, stieg der Gehalt an gelöstem Sauerstoff schnell wieder auf 100% an. Bildung von Enterotoxin wurde erstmals zu dem Zeitpunkt beobachtet, als der gelöste Sauerstoff in der Kultur verschwunden war. Während der lag-Phase und frühen logarithmischen Phase ist die Anwesenheit von Sauerstoff nach Ansicht von MARLAND besonders wichtig.

STARK und MIDDLEAUGH (1970) sowie BAIRD-PARKER (1971) beschrieben einen hemmenden Effekt von CO_2 und N_2 auf das Enterotoxinbildungsvermögen. STARK und MIDDLEAUGH (1970) fanden, daß Enterotoxin B in deutlich geringeren Mengen produziert wurde, wenn die CO_2 -Konzentrationen 50% bzw. 100% waren, bzw. überhaupt nicht mehr im Medium nachweisbar war, wenn die N_2 -Konzentration 50% bzw. 100% betrug. BAIRD-PARKER (1971) berichtete, daß nach siebentägiger Inkubation bei 30°C der Gehalt an Enterotoxin B in statischen Kulturen in Anwesenheit von Luft etwa 10fach höher war als in Anwesenheit einer Mischung aus 95% N_2 und 5% CO_2 .

Der günstige Effekt der Bewegung flüssiger Kulturmedien auf die Produktion von Staphylokokken-Stoffwechselprodukten (Lysine) während der Inkubation wurde zuerst von RAMON, BOIVIN und RICHOU (1938) beschrieben. Auch CASMAN (1940 a, b) erhielt größere Mengen an alpha-Hämolysin, wenn das Medium während der Bebrütung kontinuierlich hin und her geschüttelt wurde. Der Ertrag war sogar besser als bei ständigem Einleiten optimaler

Gasmischungen. FAVORITE und HAMMON (1941) prüften den Effekt verschiedener Möglichkeiten, die Medien zwecks besserer Sauerstoffversorgung durch Bewegung zu durchmischen. Da zu dieser Zeit noch kein quantitativer Enterotoxinnachweis möglich war, diente ihnen der Hämolysintiter als Kriterium für die Enterotoxinbildung, davon ausgehend, daß eine Korrelation zwischen Enterotoxin- und Hämolysinbildung besteht. Folgende Mechanismen wurden dabei erprobt: Horizontale Rotation (20 U/Std.) Drehung Ende über Ende (20 U/Std.) sowie Schütteln in einer Schüttelmaschine. Die bei horizontaler Rotation erzielten Ergebnisse waren identisch mit jenen, die sich bei Verwendung eines halbfesten Mediums ergaben. Die stärkeren Bewegungen erbrachten niedrigere Hämolysinmengen. Dabei wiesen die Autoren jedoch darauf hin, daß die Hämolysinbildung nicht generell als Maßstab für die Enterotoxinproduktion (gemessen im "kitten-test") herangezogen werden kann, da einzelne Stämme zwar ausreichend Erbrechen auslösende Substanzen, jedoch nur wenig oder gar kein Hämolysin bildeten. Auch DUTHIE und WYLIE (1945) schlossen aus zahlenmäßig begrenzten Untersuchungen an verschiedenen Staphylokokkenstämmen, daß die Enterotoxinproduktion durch Schütteln des Mediums nicht verbessert wird.

SURGALLA (1947) bebrütete seine zur Enterotoxinbildung bestimmten Medien in Kulturflaschen auf einer Scheibe, die sich mit 30 - 330 Umdrehungen pro Stunde drehte und erzielte damit ein besseres Staphylokokkenwachstum als bei Bebrütung in Standkulturen. Auch CASMAN (1958) sowie CASMAN und BENNETT (1963) ließen die Gefäße in einer horizontalen Position rotieren, allerdings im Gegensatz zu FAVORITE und HAMMON (1941) zwanzigmal/Minute.

Heute bedient man sich überwiegend eines "Reciprocating-Shakers" (FRIEDMAN, 1968; McLEAN, LILLY und ALFORD, 1968; TROLLER, 1971 und 1972) bzw. eines "Gyrotory-Shakers" (BERGDOLL, 1962; GENIGEORGIS und SADLER, 1966; KATO et al., 1966; MARKUS und SILVERMAN, 1968, 1969; JARVIS und LAWRENCE, 1970; DIETRICH, WATSON und SILVERMAN, 1972). Beim erstgenannten Schüttelgerät werden die Gefäße mit wählbarer Geschwindigkeit eine definierte Strecke hin und her bewegt. Beim "Gyrotory-Shaker" werden die Kulturflaschen demgegenüber in kreisförmige Bewegungen versetzt, deren Frequenz regulierbar ist. Dieses Verfahren wird insbesondere vom Food Research Institute propagiert (BERGDOLL, 1970).

KATO et al. (1966) prüften den Einfluß der Schüttelgeschwindigkeit mittels eines "Gyrotory"-Schüttelbrutschrankes (150, 210, 280 bzw. 310 U/min) an einem Enterotoxin-A-bildenden Staphylokokkenstamm. Als optimal erwies sich dabei eine Schüttelgeschwindigkeit von 280 U/min.

DIETRICH, WATSON und SILVERMAN (1972) erhielten bei vier verschiedenen Enterotoxin B-bildenden Stämmen die höchsten Enterotoxinmengen für die Stämme S-6, 135 und 295 bei 350 U/min, für Stamm 243 bei 375 U/min. Bei weiterer Steigerung der Schüttelgeschwindigkeit kam es wieder zu einer Abnahme der gebildeten Enterotoxinmengen.

Ein weiterer Faktor, der - wie bereits angedeutet - bei der Durchführung von Schüttelverfahren Einfluß auf die Menge des gebildeten Enterotoxins nimmt, ist das Verhältnis Menge des Mediums zu Fassungsvermögen des Gefäßes. FAVORITE und HAMMON (1941) kamen bei ihren Versuchen zu dem Ergebnis, daß die Menge des Mediums in 250 ml-Gefäßen optimalerweise 20 - 45 ml betragen solle.

KATO et al. (1966) füllten 250 ml-Erlenmeyerkolben mit 15, 25, 35, 50, 75 bzw. 100 ml Medium. Mit steigender Nährbodenmenge nahm die Enterotoxinausbeute/ml ab, obwohl die Enterotoxinmenge pro Erlenmeyerkolben zunahm. Für die Produktion größerer Mengen wurde empfohlen, 400 - 600 ml Medium in 2 l-Erlenmeyerkolben zu bebrüten (KATO et al., 1966). WU und BERGDOLL (1971 b) berichteten, daß bei Verwendung von 2 l-Erlenmeyerkolben die Enterotoxinproduktion verbessert wird, wenn das Gefäß nicht mit 600 ml, sondern nur mit 400 ml Medium beschickt wird. DIETRICH, WATSON und SILVERMAN (1972) ermittelten, daß der Enterotoxinertrag/ml von 160 mcg auf 300 mcg anstieg, wenn 100 ml beimpften Mediums nicht in 500 ml-Erlenmeyerkolben, sondern in 1 l -Erlenmeyerkolben bei 250 U/min bebrütet wurden. In weiteren Versuchen wurde von letztgenannten Autoren beobachtet, daß der Zusatz eines Antischaummittels, durch den das Schäumen bei hohen Umdrehungszahlen/min vollständig ausgeschaltet wurde, ohne nachteiligen Effekt auf die Enterotoxinbildung blieb.

Untersuchungen am Food Research Institute haben gezeigt, daß bei Einleiten von Luft in die Medien (Submersverfahren) weniger Enterotoxin B gewonnen wird als beim Schütteln der Medien (BERGDOLL, 1970). BERGDOLL (1970) vermutet jedoch aufgrund verschiedener Versuche, daß die Verhältnisse bei der Gewinnung von Enterotoxin A umgekehrt sind. UNTERMANN (1972 a) konnte demgegenüber zeigen, daß sich im Fermenter-Batch-Verfahren dieselben Enterotoxin A-, B- und C-Konzentrationen pro ml Nährmedium erzielen lassen wie bei einer Kultivierung in kleineren Gefäßen im Schüttelbrutschrank. Diese unterschiedlichen Resultate dürften - wie die Ergebnisse von MARLAND (1966) andeuten - u.a. auf die differierende Belüftung der submersen Kulturen zurückzuführen sein.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material

Die Eignung verschiedener Medien und Zusätze zur Produktion von Enterotoxin B wurde ebenso wie der Einfluß verschiedener anderer Faktoren (pH-Wert, Schüttelgeschwindigkeit, Belüftung) unter Verwendung von *Staphylococcus aureus* S-6 geprüft. Dieser Stamm war dem Institut von Herrn Professor M.S. Bergdoll, Food Research Institute of the University of Wisconsin in Madison (USA) zur Verfügung gestellt worden. Im Rahmen früher am Institut durchgeführter Untersuchungen waren Porzellanperlen mit der getrockneten Kultur in 50 ml Hirn-Herz-Bouillon (Oxoid CM 225) verbraucht worden. Nach Inkubation von 24 Stunden bei 37°C waren mehrere Schrägagarröhrchen (Nähragar, Oxoid CM 3) mit der angezüchteten Kultur beimpft und 48 Stunden bei 37°C bebrütet worden. Eines dieser Schrägagarröhrchen diente als Ausgangsmaterial für die eigenen Untersuchungen. Mit dieser Kultur wurden mehrere Schrägagarröhrchen beimpft, die nach Bebrütung von 48 Stunden bei 37°C durch Eintauchen der Stopfen in Paraffin luftdicht verschlossen wurden. Die Überimpfungen wurden während der laufenden Untersuchungen in vierwöchigen Abständen vorgenommen.

Voruntersuchungen hatten gezeigt, daß, wie auch BERGDOLL (1962) beschrieb, das Enterotoxinbildungsvermögen gegenüber der Ausgangskultur abgeschwächt war. Enterotoxin A ließ sich in Schüttelkulturen mit dem Objektträger-Gel-Diffusionstest nach WADSWORTH (1957) nicht mehr nachweisen.

3.2. Methodik

3.2.1. Enterotoxingewinnung

Die Kolonien eines mit *Staphylococcus aureus* S-6 beimpften Schrägagarröhrchens wurden mit 5 ml Nährbouillon (Oxoid CM 1)

abgeschwemmt. Diese Keimsuspension wurde anschließend in 250 ml Nährbouillon verbracht und 12 Stunden bei 37°C bebrütet. Mit der auf diese Weise gewonnenen Kultur wurden dann die im folgenden aufgeführten Versuche durchgeführt.

3.2.1.1. Verschiedene Nährmedien

Im ersten Versuchsabschnitt wurden verschiedene kommerziell in der Bundesrepublik vertriebene Substrate, insbesondere Peptone, auf ihre Eignung für die Produktion von Enterotoxin B geprüft. Bei diesen Substraten handelte es sich im einzelnen um:

Protein Hydrolysate Powder (Mead Johnson International, Evansville, Indiana, USA; in der Bundesrepublik zu beziehen über Fa. Lappe, Bensberg) = Pepton aus Casein, tryptisch verdaut;

Peptonum siccum (Friedrich Witte, Frankfurt/Main) = Pepsinpepton;

Neutrales Fleischpepton (Oxoid L 34) = Pepton aus Fleisch; tryptisch verdaut;

Trypton (Oxoid L 42) = Pepton aus Casein, tryptisch verdaut;

Tryptose (Oxoid L 47) = Mischpepton;

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Serva C/TLG; Enzamin AS^{*)});

Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut (Serva C/PLB; Enzamin HD^{*)});

Pepton aus Casein, enzymatisch verdaut (Serva C/EST; Enzamin YTT^{*)});

Pepton aus Casein, enzymatisch verdaut (Serva C/ESX; Enzycase^{*)});

Pepton aus Casein, enzymatisch verdaut (Serva C/ELB; Pepticas^{*)});

Pepton aus Casein, säurehydrolysiert (salzfrei) (Serva C/HSF; Hycase SF^{*)});

Pepton aus Casein, säurehydrolysiert (salzhaltig) (Serva C/HSB; Hycasamino^{*)});

Pepton aus Lactalbumin, enzymatisch verdaut (Serva L/ELG; Edamin S^{*)});

^{*)} Alte Typenbezeichnung laut Auskunft der Fa. Serva (Heidelberg).

Pepton aus Lactalbumin, enzymatisch verdaut (Serva L/EST;
Edamin T^{*)});
Pepton aus Lactalbumin, enzymatisch verdaut (Serva L/ELB;
Edamin^{*)});
Pepton aus Milchproteinen, enzymatisch abgebaut (Serva M/EST;
Fermamin I^{*)});
Pepton aus Soyamehl, enzymatisch abgebaut (Serva S/ELB;
Soyapepton^{*)});
Hirn-Herz-Bouillon (Oxoid CM 225).

Aufgrund der Ergebnisse von BERGDOLL (1962) wurden die Proteinhydrolysate für diese Versuche als 3%ige Lösung (pH 7,0) angesetzt, das Hirn-Herz-Medium entsprechend der Empfehlung des Herstellers in einer Konzentration von 3,7% (pH 7,0 bzw. 7,4). Die Medien wurden in Erlenmeyerkolben mit einem Fassungsvermögen von 2 l zu jeweils 400 ml abgefüllt (BERGDOLL, BORJA und AVENA, 1965; WU und BERGDOLL, 1971 b) und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung des Nährmediums auf Zimmertemperatur und Überprüfung des pH-Wertes wurden jeweils 20 ml der in Nährbouillon angezüchteten Staphylokokkenkultur (siehe 3.2.1.) hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Bebrütung über 24 bzw. 48 Stunden in einem Schüttelbrutschrank (Gyrotory Shaker G-25, New Brunswick Scientific, New Brunswick, N.J., USA) bei 150 Umdrehungen/Min. Da auf diese Weise pro Versuch nur zwölf Medien parallel getestet werden konnten, waren zwei Versuchsreihen erforderlich. In beiden Versuchsreihen lief das Pepton C/TLG (Serva) mit, so daß ein Vergleich der Leistungsfähigkeit möglich war.

^{*)} Alte Typenbezeichnung laut Auskunft der Fa. Serva (Heidelberg).

Anschließend wurden zur Abklärung des Einflusses der Einsaatmenge jeweils 400 ml von Protein Hydrolysate Powder (PHP), neutralem Fleischpepton, Pepton C/TLG, Pepton ELB (jeweils 3%ig) bzw. Hirn-Herz-Bouillon (pH 7,4) mit 20 bzw. 40 ml der in Nährbouillon angezüchteten Staphylokokkenkultur beimpft. Diese Medien hatten mit Ausnahme des PHP die höchsten Enterotoxin- ausbeuten/ml in der vorhergehenden Versuchsreihe erbracht.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde geprüft, inwieweit die Toxinausbeute durch die Konzentration des Mediums beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurden die zuerst nur mit 3%igen Medien vorgenommenen Versuche jetzt mit 2-, 3-, 4-, 5- bzw. 6%igen Nährmedien von PHP, neutralem Fleischpepton, Pepton C/TLG und Pepton L/ELB durchgeführt. Die übrigen Bedingungen blieben unverändert, auch die Einsaatmenge von 20 ml.

Des weiteren wurde getestet, ob durch Kombination einiger Peptone, die allein bereits gute Toxinausbeuten ermöglichten, eine Steigerung der gebildeten Toxinmengen möglich sei. Folgende Kombinationen kamen zur Anwendung:

PHP plus Pepton C/PLB

PHP plus Pepton C/TLG

PHP plus Pepton L/ELB

Pepton C/TLG plus Pepton L/ELB

PHP plus neutrales Fleischpepton

Pepton C/TLG plus neutrales Fleischpepton

Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton

Die Konzentration der beiden Einzelkomponenten wurde mit 3% gewählt. Als Vergleich lief das 3%ige Medium aus Pepton C/TLG mit. Beimpft wurden die Nährmedien (400 ml) jeweils mit 20 ml

der in der Nährbouillon angezüchteten Staphylokokkenkultur. Bebrütungszeit und -temperatur sowie Schüttelgeschwindigkeit wurden ebenfalls gegenüber der ersten Versuchsreihe nicht verändert. Letztlich wurde bei den Kombinationen Pepton C/TLG plus Pepton L/ELB, Pepton C/TLG plus neutrales Fleischpepton sowie Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton geprüft, ob durch Veränderung der Mediumkonzentration von insgesamt 6% auf 4% bessere Ergebnisse zu erzielen sind. Zu diesem Zweck wurden in der beschriebenen Art Medien hergestellt, die von jeder der beiden Komponenten 2% enthielten. Zum Vergleich lief wiederum Pepton C/TLG (3%ig) mit.

3.2.1.2. Verschiedene Zusätze

In weiteren Versuchsreihen wurde geprüft, ob durch Zusatz verschiedener, z.T. von anderen Autoren empfohlener Substanzen eine Verbesserung der Enterotoxinproduktion zu erzielen ist. Als Basalmedium wurde für diese Versuche 3% Pepton C/TLG gewählt, das sich in den vorhergehenden vergleichenden Untersuchungen (3.2.1.1.) unter den nicht kombinierten Medien als gut geeignet für die Produktion von Enterotoxin B erwiesen hatte. Bei den Zusätzen handelte es sich um:

- 0,2% Fleischextrakt "Lab Lemco" (Oxoid L 29);
- 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat (Merck 5101);
- 0,07% Magnesiumsulfat (Merck 5886) bzw.
- 1% Maltose (Merck 5912).

Fleischextrakt, K_2HPO_4 bzw. $MgSO_4$ wurden vor dem Autoklavieren zugesetzt, Maltose nach dem Autoklavieren in Form einer steril filtrierten 50%igen Lösung. Der pH-Wert der Medien mit Zusatz wurde ebenso wie der einer Kontrolle (Pepton C/TLG ohne Zusatz) auf pH 7,0 eingestellt. Beimpfung der Medien und Inkubation erfolgten in der gleichen Weise wie bei den ersten Versuchsreihen.

Außerdem wurde der Einfluß verschiedener Vitamine getestet, und zwar zuerst Thiaminiumchlorid (Merck 8181), Nicotinsäure (Merck 6817) und Calcium-D(+)-pantothenat (Merck 2316). Als Basalmedium für den ersten Versuchsabschnitt diente wieder 3% Pepton C/TLG, außerdem auch die Kombination aus 2% Pepton L/ELB und 2% neutralem Fleischpepton (Oxoid), jeweils pH 7,0. Die Vitamine wurden dem autoklavierten Medium jeweils als steril filtrierte Lösung zugesetzt. Die Endkonzentrationen der Vitamine in den beiden Medien wurde aufgrund von Literaturangaben folgenderweise gewählt:

0,00005% Thiaminiumdichlorid (SUGIYAMA, BERGDOLL und DACK, 1960);
0,001% Nicotinsäure (SUGIYAMA, BERGDOLL und DACK, 1960);
0,0001% Calcium-D(+)-pantothenat (SURGALLA, 1947).

Die Vitamine wurden außerdem auch in den angegebenen Konzentrationen kombiniert, und zwar in folgender Weise:

Thiaminiumdichlorid und Nicotinsäure;
Thiaminiumdichlorid und Calcium-D(+)-pantothenat;
Nicotinsäure und Calcium-D(+)-pantothenat bzw.
Thiaminiumdichlorid, Nicotinsäure und Calcium-D(+)-pantothenat.

Da insbesondere die Kombination Thiaminiumdichlorid und Nicotinsäure häufig den zur Enterotoxinproduktion verwendeten Medien zugesetzt wird, wurde auch untersucht, welcher Einfluß - außer bei den beiden bereits erwähnten Medien Pepton C/TLG bzw. Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton - bei Protein Hydrolysate Powder (3%), Pepton C/TLG plus Pepton C/PLB sowie Protein Hydrolysate Powder plus Pepton C/TLG (jeweils 2%) zu verzeichnen ist. Die Basalmedien liefen stets ohne Zusatz als Kontrolle mit.

Im zweiten Versuchsabschnitt, in dem als Basalmedium nur die Kombination aus 2% Pepton L/ELB plus 2% neutrales Fleisch-pepton (pH 7,0) Verwendung fand, wurden zuerst von Thiaminiumdichlorid und Calcium-D(+)-pantothenat auch höhere Konzentrationen auf ihren Einfluß auf die Bildung von Enterotoxin B getestet. Außerdem wurden zusätzlich D(+)-Biotin (Serva) und Pyridoxal-S-phosphat (Serva) auf ihre Wirkung geprüft. Die Endkonzentration der Vitamine lautete dabei folgendermaßen:

Thiaminiumdichlorid: 0,00005%; 0,0005%; 0,005% bzw. 0,05%;
Calcium-D(+)-pantothenat: 0,0001% bzw. 0,001%;
D(+)-Biotin: 0,0001% bzw. 0,001%;
Pyridoxal-S-phosphat: 0,001% bzw. 0,002%.

Als Vergleich wurde das Basalmedium auch ohne Zusatz von Vitaminen eingesetzt.

Aufgrund der guten Ergebnisse mit 0,005% Thiaminiumdichlorid bzw. 0,001% Pyridoxal-S-phosphat wurden abschließend noch folgende Kombinationen getestet:

0,005% Thiaminiumdichlorid und 0,001% Nicotinsäure;
0,005% Thiaminiumdichlorid und 0,0001% Calcium-D(+)-pantothenat;
0,005% Thiaminiumdichlorid und 0,001% Nicotinsäure und 0,0001% Calcium-D(+)-pantothenat;
0,005% Thiaminiumdichlorid und 0,0001% Biotin;
0,005% Thiaminiumdichlorid und 0,001% Pyridoxal-S-phosphat, sowie
0,001% Pyridoxal-S-phosphat und 0,005% Thiaminiumdichlorid;
0,001% Pyridoxal-S-phosphat und 0,001% Nicotinsäure;
0,001% Pyridoxal-S-phosphat und 0,0001% Calcium-D(+)-pantothenat.

Als Kontrolle lief im ersten Teil der Versuche das Basalmedium (Kombination aus 2% Pepton L/ELB plus 2% neutrales Fleischpepton) mit 0,00005% Thiaminiumdichlorid und 0,001% Nicotinsäure bzw. nur mit 0,005% Thiaminiumdichlorid mit, im zweiten Teil das Basalmedium mit 0,005% Thiaminiumdichlorid.

Nährbodenmenge, Einsaatmenge, Inkubationszeit und -temperatur sowie Schüttelgeschwindigkeit wurden bei allen Versuchen mit Vitaminzusätzen in gleicher Weise wie unter 3.2.1.1. beschrieben, beibehalten.

3.2.1.3. Verschiedene pH-Werte

Zur Ermittlung des optimalen pH-Wertes wurden Protein Hydrolysate Powder, Pepton C/TLG (jeweils 3%ig) sowie die Kombination Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton (jeweils 2%) mit 0,0001% Calciumpantothenat und 0,001% Pyridoxal-5-phosphat bzw. nur mit 0,005% Thiaminiumdichlorid als Zusatz mit 1n-NaOH bzw. 1n-HCl auf pH-Werte im Bereich von 6,5 bis 8,0 im Abstand von 0,5 pH eingestellt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden bei Pepton C/TLG bzw. Pepton L/ELB und neutralem Fleischpepton mit Calciumpantothenat und Pyridoxal-5-phosphat als Zusatz Abstände von 0,2 pH gewählt, um exaktere Aussagen über den optimalen pH-Bereich zu erhalten.

Zur Klärung der Frage, ob durch Einsatz gepufferter Medien mehr Enterotoxin gewonnen werden kann, wurden Versuche mit Pepton C/TLG durchgeführt. 3g dieses Peptons wurden in 100 ml 0,005, 0,01 bzw. 0,1 molaren Phosphatpuffer gelöst. Die Phosphatpuffer waren zuvor durch Vermischen unterschiedlicher

Mengen von Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 auf pH 6,8; 7,0 bzw. 7,2 eingestellt. Zum Vergleich lief das gleiche Medium ohne Zusatz von Phosphatpuffer ebenfalls bei den pH-Werten von 6,8, 7,0 und 7,2 mit. In allen Versuchen zur Ermittlung des Einflusses des pH-Wertes von Medien auf die Bildung von Enterotoxin B wurden die gleichen Bedingungen eingehalten wie sie unter 3.2.1.1. beschrieben sind (Einsaatmenge 20 ml, 400 ml Medium in 2 l Erlenmeyerkolben, 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C , Schüttelgeschwindigkeit 150 U/min.).

3.2.1.4. Verschiedene Arten der Belüftung des Mediums

Da von verschiedenen Autoren (FAVORITE und HAMMON, 1941; SURGALLA et al., 1951; KATO et al., 1966; MARLAND, 1966; McLEAN, LILLY und ALFORD, 1968; MARKUS und SILVERMAN, 1968 und 1969 u.a.) auf die Vorteile einer guten Belüftung des Mediums hingewiesen wurde, wurde im abschließenden Versuchsabschnitt zu klären versucht, inwieweit durch Veränderung der Schüttelgeschwindigkeit (bisher 150 U/min) bzw. der Nährbodenmenge – beides Faktoren, die die Sauerstoffübertragung beeinflussen (DIETRICH, WATSON und SILVERMAN, 1972) – sowie durch zusätzliches Einleiten verschiedener Gase eine Verbesserung der Enterotoxinproduktion erzielt werden kann.

In der ersten Versuchsreihe wurde der Einfluß verschiedener Schüttelgeschwindigkeiten geprüft. Auf pH 7,0 eingestellte Medien aus 3% PHP, 3% Pepton C/TLG bzw. 2% Pepton L/ELB plus 2% neutralem Fleischpepton (mit Zusatz von 0,0001% Calciumpantothenat und 0,001% Pyridoxalphosphat) wurden bei 100, 150, 280 (KATO et al., 1966) bzw. 350 U/min (DIETRICH, WATSON und SILVERMAN, 1972) 24 Std. bebrütet. Da nur zwei Schüttelbrutschränke zur Verfügung standen, konnten nur zwei Umdrehungsgeschwindigkeiten gleichzeitig getestet werden. Um Fehler durch zeitlich unterschiedliche Ansätze weitgehend auszuschalten, wurde daher folgender-

maßen vorgegangen: Die 12 Std. bei 37°C bebrütete mit *Staphylococcus aureus* S-6 beimpfte Nährbouillon (siehe 3.2.1.) wurde auf Kühlschranktemperatur (6°C) abgekühlt, bevor 20 ml davon nach vorheriger Bestimmung der Dichte zwei Gefäßen mit dem jeweiligen Medium (400 ml) zugesetzt wurden. Anschließend wurde für 24 Std. parallel bei 100 bzw. 150 U/min bebrütet. Nach 24 Std. wurden zwei weitere Erlenmeyerkolben mit dem jeweiligen Medium, das wie im ersten Versuchsteil Zimmertemperatur aufwies, mit 20 ml der bei Kühlschranktemperatur aufbewahrten Bouillon mit *Staphylococcus aureus* S-6 beimpft und 24 Std. parallel bei 280 bzw. 350 U/min inkubiert.

Die optische Dichte der Keimsuspension wurde ebenfalls vor Zusatz zum Medium gemessen. In der nächsten Versuchsreihe wurden am ersten Tag die Schüttelgeschwindigkeiten von 280 bzw. 350 U/min geprüft, am zweiten Tag die beiden geringeren, um auf diese Weise mögliche Unterschiede seitens der Keimeinsaat auszuschalten. Parallel zu diesen Versuchen wurde jeweils ein Erlenmeyerkolben im Brutschrank bei 37°C bebrütet, um festzustellen, ob durch die Bewegung der Gefäße bei 100 U/min bessere Enterotoxinausbeuten erzielt werden können als mit statischen Kulturen. Abschließend wurden die Mittelwerte der beiden Versuche gebildet.

Um festzustellen, ob die bisher in Anlehnung an die Angaben von KATO et al. (1966) bzw. WU und BERGDOLL (1971 b) verwendeten Nährbodenmengen (400 ml in 2 l Erlenmeyerkolben) günstig sind oder im Hinblick auf eine verbesserte Sauerstoffübertragung und Enterotoxinproduktion herabgesetzt werden sollten, wurden Versuche mit 50, 100, 200 bzw. 400 ml Medium pro 2 l-Erlenmeyerkolben durchgeführt. Als Medium

wurde 2% Pepton L/ELB plus 2% neutrales Fleischpepton mit Zusatz von 0,0001% Calciumpantothenat und 0,001% Pyridoxalphosphat (pH 7,0) gewählt. Die Medien wurden mit jeweils 5% der Staphylokokken-haltigen Nährbouillon (3.2.1.) beimpft, d.h. mit 2,5 ml, 5 ml, 10 ml bzw. 20 ml. Die Schüttelgeschwindigkeit wurde im Hinblick auf die geringe Nährbodenmenge von 50 ml in einem Erlenmeyerkolben auf 150 U/min eingestellt. Die Ergebnisse wurden nach 24 und 48 Std. Bebrütung bei 37°C registriert.

Im letzten Versuchsabschnitt wurde der Einfluß verschiedener Gase auf das Enterotoxinbildungsvermögen geprüft. Als Medium diente wiederum 2% Pepton L/ELB plus 2% neutrales Fleischpepton mit 0,0001% Calciumpantothenat und 0,001% Pyridoxalphosphat (pH 7,0). Das Medium wurde in Mengen zu 400 ml in 2 l-Erlenmeyerkolben gegeben und nach Beimpfung mit 20 ml der angezüchteten Staphylokokkenkultur 24 Std. bei 130 U/min geschüttelt. Eine höhere Schüttelgeschwindigkeit war aus versuchstechnischen Gründen nicht möglich. Als Gase für die "Belüftung" des Mediums dienten Sauerstoff, Kohlendioxyd bzw. Stickstoff (Linde), von denen pro Minute 20 - 30 ccm in das Medium eingeleitet wurden. Zu diesem Zweck waren 2 l-Erlenmeyerkolben (Enghals) mit einem Stopfen verschlossen worden, der an zwei Stellen für Glasröhrchen, die als Zu- bzw. Ableitung für das Gas dienten, durchbohrt worden war.

Die Zuleitung, die bis auf den Boden des Gefäßes reichte, war an einer Stelle zu einer sog. Olive erweitert worden, die mit Glaswolle gut ausgestopft wurde. Gummistopfen samt Glasröhrchen und Silikonschläuchen zum Anschluß an den Druckminderer (Drägerwerke, Lübeck), wurden nach Aus-

stopfung der Olive autoklaviert und unter sterilen Kautelen in die Öffnung der Erlenmeyerkolben verbracht. Die aus den Erlenmeyerkolben durch das oberhalb des Mediums beginnende Glasröhrchen entweichenden Gas-mischungen wurden direkt aus dem "Gyrotory-Shaker" ausgeleitet. Zum Vergleich lief eine Probe mit, die nur bei 130 U/min geschüttelt wurde, ohne daß zusätzlich Gas eingeleitet wurde.

3.2.2. Nachweisverfahren

Nach Bebrütung der Medien für 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

Quantitative Bestimmung des Gehältes an Enterotoxin B mit dem Einfach-Gel-Diffusionstest nach OUDIN (1952);

Messung der optischen Dichte bei 655 nm (KATO et al, 1966; BERGDOLL, 1970) mit dem Spectrophotometer DB-T der Firma Beckman;

Messung des pH-Wertes.

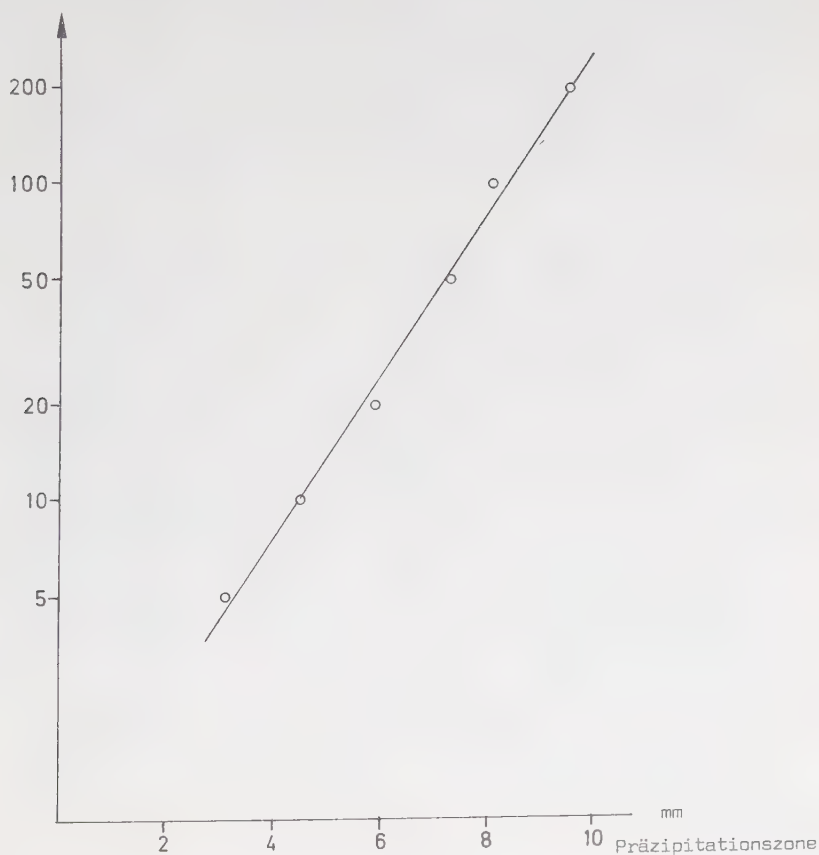
Zur Vorbereitung des Oudin-Tests wurden Glasröhrchen von ca. 6 mm Durchmesser und ca. 90 mm Länge, nachdem sie zuvor gesäubert, entfettet und getrocknet worden waren, an der Innenfläche mit 0,5%igem Agar beschichtet - um der Gelschicht einen besseren Halt zu geben - und 24 Stunden lang bei 80°C im Wärmeschrank getrocknet. Anschließend wurden gleiche Teile gepufferten Agars (0,6 g Special Agar Noble-Difco- in 100 ml 0,02 m phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,4) und Antiserumverdünnung (ebenfalls in 0,02 m phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung) bei 50°C vermischt. Die erforderliche Antiserumverdünnung wurde

in Vorversuchen ermittelt. Von dieser Mischung aus Agargel und Antiserum wurden mit Hilfe einer Pasteur-Pipette jeweils 0,4 ml in ein vorbereitetes Oudinröhrchen gegeben; das Röhrchen wurde mit Parafilm verschlossen und nach Erstarren der Agarschicht im Kühlschrank bis zur Verwendung aufbewahrt.

Zur Bestimmung des Enterotoxingehaltes der Proben wurden - wiederum mit einer Pasteur-Pipette - 0,4 ml der betreffenden Probe auf die antiserumhaltige Agarsäule verbracht. Auf ein Zentrifugieren der Probe zur Entfernung der Keime wurde verzichtet, nachdem in orientierenden Vorversuchen keine Unterschiede in den Resultaten unzentrifugierter und zentrifugierter Proben festgestellt werden konnten. Das mit der Probe beschickte Röhrchen wurde dann bei 30°C 24 Stunden bebrütet (WEIRETHER et al., 1966). War in der Probe Enterotoxin B vorhanden, kam es zur Ausbildung einer Präzipitationsbande, deren Breite mit einer Schublehre (Mitotoyo, Japan) gemessen wurde. Die Enterotoxinmengen/ml wurden mittels einer Eichkurve abgeschätzt, die unter Verwendung von Enterotoxin B (Makor Chemicals, Jerusalem) erstellt wurde (Abb. 1). Zu diesem Zweck wurde das Produkt, das nach Angaben des Herstellers 0,36 mg Enterotoxin pro mg Substanz enthält, in 0,02 m phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,4) gelöst.

Abbildung 1: Eichkurve zur Bestimmung des Gehaltes
an Enterotoxin B/ml

mcg Enterotoxin B/ml



3.3. Ergebnisse der Untersuchungen über die Einflüsse verschiedener Faktoren auf die Bildung von Enterotoxin B

3.3.1. Einfluß des Nährmediums

Verschiedene Nährmedien wurden allein oder in Kombination mit anderen Medien auf ihre Eignung zur Produktion von Enterotoxin B in großen Mengen geprüft. Im ersten Versuchsabschnitt wurden 3%ige Lösungen von 17 verschiedenen Proteinhydrolysaten bzw. 3,7%iges Hirn-Herz-Medium mit 20 ml einer 12 Stunden bei 37°C inkubierten Bouillonkultur von *Staphylococcus aureus* S-6 beimpft. In den Tabellen 1 und 2 sind die Ergebnisse für den Toxingehalt/ml, der mittels vorher erstellter Eichkurve abgeschätzt wurde, für die Zunahme der optischen Dichte (bei 655 nm) im Vergleich zum inokulierten, aber unbebrüteten Ausgangsmedium sowie für den End-pH nach 24 bzw. 48stündiger Bebrütung im Schüttelbrutschrank mit 150 U/min wiedergegeben.

Im ersten Versuchsabschnitt (Tab. 1) wurde nach 24 Stunden Bebrütung am meisten Enterotoxin B im Medium aus Pepton C/TLG nachgewiesen, etwas weniger in der auf pH 7,4 eingestellten Hirn-Herz-Bouillon. Auch in dem Medium aus neutralem Fleischpepton, Pepton L/ELB bzw. Pepton C/ELB wurden vergleichsweise noch hohe Enterotoxinkonzentrationen gefunden, während andererseits die Ausbeute mit Trypton gering war bzw. in Pepton M/EST überhaupt kein Enterotoxin B ermittelt wurde. Nach 48 Stunden Inkubation hatte sich das Bild insofern etwas gewandelt, als im Medium aus Pepton C/TLG etwa die doppelte Menge Enterotoxin registriert wurde, bei den anderen Medien aber nur geringfügige Veränderungen gegenüber den Ergebnissen nach 24 Stunden festzustellen waren (Tab. 1).

Die optische Dichte (O.D.) der Medien war nach 24 Stunden mit Ausnahme von Trypton um mehr als 2,0 im Vergleich zum Ausgangs-

Tabelle 1: Konzentration von Enterotoxin B (mcg/ml), Zunahme der optischen Dichte (O.D.) und End-pH in verschiedenen Medien nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

Medium	Enterotoxin (mcg/ml)		O.D.		pH	
	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.
PHP (Mead Johnson International)	13,4	10,4	3,0	4,0	7,7	8,2
Neutrales Fleisch-pepton (Oxoid)	18,4	26,0	2,6	2,7	8,0	8,5
Trypton (Oxoid)	6,4	7,4	1,4	1,7	7,8	8,4
Tryptose (Oxoid)	12,0	12,8	2,6	2,9	7,7	8,4
C/TLG (Serva Pepton) (Enzamin AS)	26,0	50,0	2,6	2,9	7,7	8,2
C/PLB (Serva Pepton) (Enzamin HD)	11,0	14,2	2,4	2,9	8,1	8,1
C/ELB (Serva Pepton) (Pepticase)	16,4	17,2	2,7	2,9	7,7	8,0
L/ELG (Serva Pepton) (Edamin S)	13,4	13,4	2,9	3,2	8,2	8,3
L/ELB (Serva Pepton) (Edamin)	17,2	22,0	2,7	3,9	8,3	8,3
M/EST (Serva Pepton) (Fermamin I)	0,0	0,0	2,6	2,8	7,9	8,5
Hirn-Herz-Bouillon (Oxoid) pH 7,0	12,0	17,2	2,8	3,2	6,9	8,2
Hirn-Herz-Bouillon (Oxoid) pH 7,4	20,0	20,0	2,8	3,2	7,2	8,1

wert angestiegen (Tab. 1). Am stärksten war die Zunahme beim Medium aus Protein Hydrolysate Powder (3,0), gefolgt von Pepton L/ELG sowie Hirn-Herz-Bouillon (pH 7,0 und 7,4). Ähnliche Resultate wurden nach 48 Stunden Inkubation registriert. Es wurde wiederum bei dem Medium aus Protein Hydrolysate Powder (PHP) die stärkste Zunahme der optischen Dichte (4,0) gemessen, etwas niedrigere Werte wurden bei Pepton L/ELB (3,9) sowie Hirn-Herz-Bouillon (pH 7,0 und 7,4) bzw. Pepton L/ELG (3,2) abgelesen. Auch nach 48 Stunden wies das Trypton-Medium die höchste Lichtdurchlässigkeit auf.

Hinsichtlich des pH-Wertes der Medien, der mit Ausnahme der einen Charge Hirn-Herz-Bouillon zu Versuchsbeginn 7,0 betrug, war festzustellen, daß nach 24 Stunden erst vier Medien (neutrales Fleischpepton, Pepton C/PLB, Pepton L/ELG und Pepton L/ELB) einen Wert von mindestens 8,0 aufwiesen, während nach 48 Stunden alle Medien diesen Wert erreicht oder deutlich überschritten hatten (Tab. 1).

Im zweiten Versuchsabschnitt (Tab. 2), in dem die restlichen Medien sowie zum Vergleich die bereits im ersten Versuchsabschnitt eingesetzte Bouillon aus Pepton C/TLG geprüft wurden, war nach 24 und 48 Stunden ebenfalls wieder im Medium aus Pepton C/TLG am meisten Enterotoxin nachzuweisen. Schon das zweitbeste Medium (Pepton S/ELB) fiel jedoch deutlich ab, da hierin weniger als 50% der im vorgenannten Medium registrierten Konzentration vorhanden war. In drei Medien (Pepton C/EST; Pepton L/EST; Peptonum siccum) wurde kein oder nur sehr wenig Enterotoxin produziert.

Hinsichtlich der optischen Dichte war nach 24 Stunden lediglich bei den Medien aus Pepton C/TLG bzw. Pepton S/ELB ein

Tabelle 2: Konzentration von Enterotoxin B (mcg/ml), Zunahme der optischen Dichte (O.D.) und End-pH in verschiedenen Medien nach 24 bzw. 48 Bebrütung bei 37°C

Medium	Enterotoxin (mcg/ml)		O.D.		pH	
	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.
Peptonum siccum (Witte)	0,0	1,5	1,9	2,0	7,9	8,2
C/TLG (Serva Pepton) (Enzamin AS)	14,0	22,0	2,6	2,7	7,8	8,3
C/EST (Serva Pepton) (Enzamin YTT)	0,0	0,0	1,0	1,1	8,4	8,3
C/ESX (Serva Pepton) (Enzycase)	3,2	5,0	1,7	1,7	7,7	8,3
C/HSF (Serva Pepton) (Hycase SF)	3,3	3,3	1,4	2,0	7,9	8,2
C/HSH (Serva Pepton) (Hycasamino)	3,4	3,4	1,7	1,7	8,1	8,1
L/EST (Serva Pepton) (Edamin T)	0,0	0,0	0,4	0,6	7,9	8,5
S/ELB (Serva Pepton) (Soyapepton)	6,4	10,0	2,6	2,8	7,8	8,3

Anstieg über 2,0 zu verzeichnen, die geringste Dichtezunahme mit 0,4 zeigte Pepton L/EST (Tab. 2). Nach 48 Stunden war die Abnahme der Lichtdurchlässigkeit (O.D. = 2,8) gegenüber dem Ausgangswert innerhalb der Versuchscharge am stärksten bei Pepton S/ELB, etwas weniger ausgeprägt war der Unterschied bei den Medien aus Pepton C/TLG (2,7), Pepton C/HSF bzw. Witte-Pepton (je 2,0). Bei der Bouillon aus Pepton L/EST stieg die optische Dichte am geringsten an (0,6).

Der pH-Wert der Medien lag nach 24 Stunden mit zwei Ausnahmen (Pepton C/EST und Pepton C/HSF) unter 8,0, nach 48 Stunden in allen Fällen über 8,0 (Tab. 2).

Zur Ermittlung des Einflusses der Einsaatmenge auf die Enterotoxinbildung wurden 3%ige Medien von Pepton C/TLG, Pepton L/ELB, neutralem Fleischpepton, PHP bzw. Hirn-Herz-Bouillon mit 5% bzw. 10% der in Nährbouillon angezüchteten Staphylokokkenkultur beimpft. Nach 24 Stunden war nur in den Medien aus PHP bzw. aus Hirn-Herz-Bouillon bei der Beimpfung mit 40 ml eine stärkere Enterotoxinbildung zu registrieren, wobei der Unterschied bei der Hirn-Herz-Bouillon nur sehr gering war (Tab. 3). Nach 48 Stunden Bebrütung war nur beim Medium aus PHP ein höherer Enterotoxinertrag bei der Inokulationsmenge von 10% festzustellen (16,8 mcg/ml) als bei jener von 5% (13,8 mcg/ml). Während zu diesem Zeitpunkt in der Hirn-Herz-Bouillon keine Unterschiede gefunden wurden, erbrachte die Einsaat von nur 20 ml für die restlichen Medien eine höhere Enterotoxinausbeute. Bei den Medien aus Pepton C/TLG sowie Pepton L/ELB war der Unterschied besonders stark (Tab. 3). Von den sechs im Versuch stehenden Medien erwies sich wiederum Pepton C/TLG - insbesondere nach 48 Stunden Bebrütung - als am besten für die Bildung von Enterotoxin B geeignet.

Tabelle 3: Einfluß verschiedener Einsaatmengen auf die Enterotoxin B-Produktion (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und den pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

Medium		Enterotoxin (mcg/ml)		O.D.		pH	
		24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.
C/TLG	-20 ml	17,0	34,0	2,7	2,7	8,0	8,0
	-40 ml	12,0	16,4	2,9	2,9	8,0	8,4
L/ELB	-20 ml	14,0	22,0	2,7	2,7	7,7	7,9
	-40 ml	8,8	10,4	2,9	2,9	7,7	8,2
Neutrales- Fleisch- pepton	-20 ml	15,8	17,0	2,6	2,6	8,0	8,0
	-40 ml	8,5	10,4	2,6	2,6	8,0	8,3
PHP	-20 ml	10,0	13,8	2,8	2,8	8,0	8,0
	-40 ml	15,8	16,8	3,0	3,0	8,0	8,0
Hirn-Herz- Bouillon (pH 7,4)	-20 ml	7,4	14,0	2,7	2,7	6,6	7,3
	-40 ml	8,0	14,0	2,9	2,9	6,9	8,2

Die optische Dichte war bei allen Medien mit Ausnahme desjenigen aus neutralem Fleischpepton sowohl nach 24stündiger als auch nach 48stündiger Inkubation stärker angestiegen, wenn den 400 ml Medium 40 ml der in Nährbouillon angezüchteten Staphylokokkenkultur zugesetzt worden waren (Tab. 3).

Hinsichtlich der pH-Werte konnte nach 24stündiger Bebrütung mit Ausnahme der Hirn-Herz-Bouillon kein durch die Einsaatmenge bedingter Unterschied festgestellt werden (Tab. 3). Bei der Hirn-Herz-Bouillon war der pH-Wert bei der Einsaatmenge von 40 ml stärker alkalisch (pH 6,9) als bei dem mit 20 ml beimpften Medium (pH 6,6). Nach 48 Stunden waren die pH-Werte für PHP bei beiden Einsaatmengen gleich hoch, während sie bei den Nährböden aus Pepton C/TLG, Pepton L/ELB, neutralem Fleischpepton sowie bei Hirn-Herz-Bouillon bei der größeren Einsaatmenge stärker alkalisch waren (Tab. 3).

Da von verschiedenen Seiten (BERGDOLL, 1962; KATO et al., 1966; DRYE und MAH, 1969; WU und BERGDOLL, 1971 b) darauf hingewiesen wurde, daß die Toxinausbeute mit steigender Konzentration der Medien zunimmt, wurden in einer Versuchsreihe aus Pepton C/TLG bzw. aus PHP, in einer weiteren Versuchsreihe aus Pepton L/ELB bzw. aus neutralem Fleischpepton Medien unterschiedlicher Konzentrationen (2% - 6%) hergestellt. Pepton C/TLG zeigte nach 24 Stunden die besten Enterotoxinerträge bei Verwendung des 2%igen (14,9 mcg/ml) und des 3%igen Mediums (13,2 mcg/ml), den geringsten Ertrag (10,4 mcg/ml) im 6%igen Medium (Tab. 4). Hingegen war nach 48 Stunden das in 3%iger Konzentration angesetzte Medium allen anderen deutlich überlegen (35,0 mcg Enterotoxin/ml). Als die nächstbeste Konzentration für Pepton C/TLG erwiesen sich 4% (28,0 mcg/ml), die übrigen Konzentrationen (2%, 5% bzw. 6%) ergaben ungefähr

Tabelle 4: Einfluß verschiedener Konzentrationen von Pepton C/TLG bzw. PHP auf die Produktion von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

	C/TLG			PHP		
	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std. 48 Std.	O.D. 24 Std. 48 Std.	pH 24 Std. 48 Std.	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std. 48 Std.	O.D. 24 Std. 48 Std.	pH 24 Std. 48 Std.
2%	14,9 19,0	2,7 3,0	7,6 8,3	9,4 14,0	2,8 3,0	7,2 7,9
3%	13,2 35,0	2,9 3,0	7,8 8,1	9,6 15,8	2,9 3,0	7,5 8,0
4%	12,0 28,0	2,7 3,0	7,5 7,9	9,4 15,8	2,8 3,0	7,4 8,0
5%	12,0 18,5	2,7 3,0	7,8 8,3	9,6 16,4	3,0 3,1	7,8 8,0
6%	10,4 18,5	2,6 3,0	7,5 7,8	7,0 11,2	3,0 3,1	7,8 7,8

gleiche Toxinmengen (18,5 - 19,0 mcg/ml). Der Anstieg gegenüber den Werten nach 24 Stunden war besonders deutlich bei den Medien aus 3% bzw. 4% C/TLG (weit über 100%).

Das Medium aus PHP ergab nach 24 Stunden in 2%, 3%, 4% und 5%iger Konzentration annähernd gleiche Enterotoxinmengen (9,4 - 9,6 mcg/ml), weniger Enterotoxin (7,0 mcg/ml) erbrachte die Inkubation in 6% PHP (Tab. 4). Nach 48 Stunden wurde die beste Enterotoxinausbeute (16,4 mcg/ml) in dem Medium aus 5% PHP erzielt; eine nahezu gleich starke Enterotoxinproduktion (15,8 mcg/ml) wurde jedoch in dem 3% bzw. 4%igen Medium registriert. Auch bei dieser Untersuchung ergab das Medium aus 6% PHP den niedrigsten Enterotoxingehalt (11,2 mcg/ml). Der Anstieg in der Enterotoxinkonzentration nach 48 Stunden gegenüber derjenigen nach 24 Stunden lag bei allen Medien unter 100%. Beim Vergleich der mit PHP bzw. Pepton C/TLG gebildeten Enterotoxinmengen fällt auf, daß in dem letztgenannten Medium unabhängig von der Konzentration nach gleicher Bebrühtungszeit stets mehr Enterotoxin zu finden war.

Bei Testung von Pepton C/TLG war die optische Dichte nach 24 Stunden am größten im 3%igen Medium; nach 48 Stunden waren keine konzentrationsabhängigen Unterschiede gegeben. Beim PHP war dagegen sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden bei dem 5%igen und 6%igen Medium die geringste Lichtdurchlässigkeit zu registrieren (Tab. 4).

Die pH-Werte der Medien aus Pepton C/TLG schwankten nach 24stündiger Bebrütung zwischen 7,5 und 7,8, nach 48 Stunden zwischen 7,8 und 8,3. Beim PHP waren nach 24 Stunden das 5%ige und 6%ige Medium stärker alkalisch (pH 7,8) als die anderen Medien (pH 7,2 - 7,5). Nach 48 Stunden ergaben sich

Tabelle 5: Einfluß verschiedener Konzentrationen von Pepton L/ELB bzw. neutralem Fleischpepton auf die Produktion von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

Konzentration	L/ELB			neutrales Fleischpepton		
	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std. 48 Std.	O.D. 24 Std. 48 Std.	pH 24 Std. 48 Std.	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std. 48 Std.	O.D. 24 Std. 48 Std.	pH 24 Std. 48 Std.
2%	10,4 11,2	2,7 2,7	8,2 8,3	7,1 7,4	2,4 2,4	8,0 8,3
3%	11,2 15,8	2,7 2,7	7,9 7,9	8,4 13,2	2,6 2,6	8,1 8,2
4%	9,2 12,8	2,6 2,9	7,2 7,6	11,5 19,3	2,6 2,6	7,7 7,8
5%	8,8 12,8	2,5 2,8	7,3 7,6	10,0 22,0	2,7 2,9	7,7 7,8
6%	8,8 12,8	2,5 2,8	7,3 7,6	7,8 13,5	2,7 2,9	7,4 7,7

jedoch ebenso wie bei Pepton C/TLG keine eindeutigen Beziehungen zwischen pH-Wert und Konzentration des Mediums. Gemessen wurden Werte zwischen pH 7,8 und pH 8,0 (Tab. 4).

Das im zweiten Versuchsabschnitt geprüfte Medium aus Pepton L/ELB (Tab. 5) erwies sich nach 24 Stunden Bebrütung in 3%iger Konzentration als am geeignetsten für die Enterotoxin B-Synthese (11,2 mcg/ml), die zweithöchste Enterotoxinausbeute wurde in dem 2%igen Medium erzielt (10,4 mcg/ml). 5%- und 6%ige Konzentration erbrachten zu diesem Zeitpunkt den geringsten Enterotoxingewinn. Auch nach 48 Stunden wurde wiederum in dem Medium aus 3% Pepton L/ELB die höchste Enterotoxin-konzentration gefunden (15,8 mcg/ml). Im Gegensatz zur Ablesung nach 24 Stunden wurde jedoch am wenigsten Enterotoxin (11,2 mcg/ml) in dem in 2%iger Konzentration vorliegenden Nährboden gebildet.

Einheitliche Resultate zeigten bei der nach 48 Stunden erfolgten Probeentnahme das Medium in 4%-, 5%- und 6%iger Konzentration (12,8 mcg/ml). Die Enterotoxinwerte lagen nach 48 Stunden höchstens um 50% über jenen nach 24 Stunden.

Das Medium aus neutralem Fleischpepton wies bei der Untersuchung nach 24 Stunden in 4%iger Konzentration den größten Enterotoxingehalt (11,5 mcg/ml) auf, gefolgt von dem in 5%iger Konzentration angesetzten Medium (Tab. 5). Den geringsten Enterotoxinertrag erbrachte 2% neutrales Fleischpepton (7,1 mcg/ml). Die 48stündige Inkubation ergab für neutrales Fleischpepton in 5%iger Konzentration den stärksten Enterotoxingewinn (22,0 mcg/ml), das in 4%iger Konzentration geprüfte Medium lag jetzt an zweiter Stelle (19,3 mcg/ml). In 2%iger Konzentration wies das Medium auch nach 48 Stunden den niedrigsten Entero-

toxin B-Ertrag auf. Bei dem 5%igen Fleischpepton-Medium war die nach 48 Stunden gebildete Enterotoxinmenge/ml etwas mehr als doppelt so groß wie nach 24 Stunden. Beim Vergleich der Leistungsfähigkeit von neutralem Fleischpepton und Pepton L/ELB ergibt sich eine Überlegenheit des erstgenannten Mediums bei 4% und 5%iger Konzentration, während bei den 2% und 3%igen Medien Pepton L/ELB besser war. Die relativ beste Ausbeute innerhalb dieses Versuchsabschnittes wurde mit 5% neutralem Fleischpepton erzielt.

Bei Pepton L/ELB nahmen die Werte für die optische Dichte nach 24stündiger Inkubation mit steigender Mediumkonzentration ab, während nach 48 Stunden der höchste Wert beim 4%igen Medium registriert wurde (Tab. 5). Beim neutralen Fleischpepton stieg nach beiden Bebrütungszeiten die optische Dichte mit zunehmender Mediumkonzentration an. Die pH-Werte des 2%igen und 3%igen Mediums aus Pepton L/ELB sowie aus neutralem Fleischpepton waren sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden stärker alkalisch als die der anderen Konzentrationen (Tab. 5).

Auf den bisherigen Ergebnissen aufbauend wurde versucht, durch Kombination der Medien, mit denen gute Enterotoxinausbeuten erzielt bzw. von anderen Autoren berichtet worden waren (Pepton C/TLG; Pepton L/ELB; neutrales Fleischpepton; PHP), eine weitere Steigerung der Enterotoxinproduktion zu erreichen. Die Nährmedien wurden paarweise miteinander kombiniert, wobei für die beiden Komponenten jeweils eine Konzentration von 3% gewählt wurde.

Nach 24 Stunden wurde am meisten Enterotoxin (8,7 mcg/ml) in dem als Kontrolle mitlaufenden 3%igen Medium aus Pepton C/TLG nachgewiesen (Tab. 6). Von den kombinierten Medien erbrachte

Tabelle 6: Einfluß kombinierter Medien auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

Medium	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std. 48 Std.	O.D. 24 Std. 48 Std.	pH 24 Std. 48 Std.
PHP + C/PLB	4,8 6,4	2,9 3,0	7,6 7,8
PHP + C/TLG	6,4 8,2	2,9 3,0	7,7 7,8
PHP + L/ELB	4,3 6,4	2,6 2,9	7,3 7,4
PHP + neutr. Fleisch- pepton	8,2 9,6	2,7 2,9	7,4 7,7
C/TLG + L/ELB	8,5 10,6	2,6 2,9	7,4 7,6
C/TLG + neutr. Fleisch- pepton	6,7 10,0	2,7 2,9	7,5 7,6
L/ELB + neutr. Fleisch- pepton	7,5 14,4	2,7 2,9	7,4 7,6
C/TLG	8,7 10,0	2,8 3,0	7,8 8,6

Pepton C/TLG plus Pepton L/ELB die größte Enterotoxinausbeute (8,5 mcg/ml), gefolgt von PHP plus neutralem Fleischpepton (8,2 mcg/ml). In den drei anderen mit PHP kombinierten Medien wurde zu diesem Zeitpunkt noch weniger Enterotoxin gefunden.

Ein verändertes Bild ergab die Ablesung nach 48 Stunden Inkubation. In dem Medium aus Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton wurde am meisten Enterotoxin produziert (14,4 mcg/ml). Deutlich geringere Enterotoxinmengen wurden in dem zweitbesten Medium aus Pepton C/TLG plus Pepton L/ELB nachgewiesen (10,6 mcg/ml). Alle kombinierten Medien, die als eine Teilkomponente PHP enthielten, waren dem als Vergleichsmedium verwendeten Medium aus Pepton C/TLG unterlegen. Die Bouillon aus Pepton C/TLG plus neutralem Fleischpepton erreichte den gleichen Erfolg wie das Vergleichsmedium.

Die optische Dichte hatte nach 24 Stunden nur in den Medien aus PHP plus Pepton C/PLB bzw. aus PHP plus Pepton C/TLG stärker zugenommen als in dem Medium aus Pepton C/TLG (O.D.: 2,8). Nach 48 Stunden Inkubation zeigten die drei erwähnten Medien eine gleich starke Zunahme der optischen Dichte (3,0), bei allen übrigen Medien betrug sie 2,9 (Tab. 6).

Der pH-Wert lag bei allen Medien nach 24 Stunden im Bereich von 7,3 bis 7,8. Dabei war das Vergleichsmedium aus Pepton C/TLG alkalischer als die kombinierten Medien. Auch nach 48 Stunden war das Vergleichsmedium am stärksten alkalisch (pH 8,6), während die Kombination aus PHP plus Pepton L/ELB nur einen pH-Wert von 7,4 erreicht hatte (Tab. 6).

In der folgenden Versuchsreihe wurde untersucht, ob ähnlich wie bei den Versuchen mit Einzelmedien auch bei Kombinationen

4%ige Medien für die Gewinnung von Enterotoxin B besser geeignet sind als 6%ige. Diese Experimente wurden jedoch nur mit den drei Kombinationen vorgenommen, bei denen im vorhergehenden Versuchsabschnitt zumindest gleich gute Enterotoxin- ausbeuten registriert worden waren wie bei der mitlaufenden Kontrolle aus Pepton C/TLG. In den kombinierten Medien waren mit Ausnahme des Mediums aus Pepton C/TLG plus Pepton L/ELB nach 24 Stunden größere Enterotoxinmengen nachzuweisen, wenn die beiden Komponenten jeweils nur 2%ig zur Anwendung gekommen waren (Tab. 7). Bei der erwähnten Ausnahme bestanden demgegenüber keine von der Konzentration des Mediums abhängigen Unterschiede hinsichtlich des Enterotoxinertrages. Die besten Ergebnisse wurden sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden mit der Kombination 2% L/ELB plus 2% neutrales Fleischpepton erzielt (16,4 mcg/ml). Während nach 24stündiger Inkubation nur mit der erwähnten Kombination mehr Enterotoxin als mit dem Vergleichsmedium aus Pepton C/TLG produziert wurde, hatten nach 48 Stunden alle geprüften Kombinationen mit Ausnahme von 3% Pepton C/TLG plus 3% Pepton L/ELB sowie 3% Pepton C/TLG plus 3% neutrales Fleischpepton bessere Ergebnisse als die Kontrolle erbracht.

Die Messung der optischen Dichte ergab nur bei den Kombinationen Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton (nach 24 Stunden) sowie Pepton C/TLG plus Pepton L/ELB (nach 48 Stunden) geringe Unterschiede, die sich auf die Konzentration des Mediums zurückführen lassen (Tab. 7). Das Vergleichsmedium aus Pepton C/TLG wies jeweils die größte optische Dichte (2,8 bzw. 3,0) auf.

Die pH-Werte, die nach 24 und nach 48 Stunden gemessen wurden, zeigten bei allen untersuchten Kombinationen insofern ein ein-

Tabelle 7: Einfluß kombinierter Medien unterschiedlicher Konzentrationen auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

Medium	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std., 48 Std.	O.D. 24 Std., 48 Std.	pH 24 Std., 48 Std.
C/TLG + L/ELB	a 2% 8,5 13,5	2,6 2,8	7,6 8,0
	a 3% 8,5 10,4	2,6 2,9	7,4 7,6
C/TLG + neutrales Fleischpepton	a 2% 8,2 13,5	2,7 2,9	7,8 7,8
	a 3% 7,0 9,6	2,7 2,9	7,5 7,6
L/ELB + neutrales Fleischpepton	a 2% 12,8 16,4	2,8 2,9	7,5 7,9
	a 3% 7,4 14,0	2,7 2,9	7,3 7,4
C/TLG	a 3% 9,0 10,8	2,6 3,0	7,8 8,6

heitliches Bild, als sie bei der geringeren Konzentration der Medien um 0,2 - 0,5 pH höher lagen (Tab. 7). Das Vergleichsmedium wies bei beiden Ablesungen den höchsten pH-Wert auf, nach 24 Stunden zusammen mit der Kombination aus 2% Pepton C/TLG plus 2% neutralem Fleischpepton.

3.3.2. Einfluß verschiedener Zusätze

Bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener Zusätze ("Lab Lemco" Fleischextrakt; Dikaliumhydrogenphosphat; Magnesiumsulfat; Maltose) auf die Bildung von Enterotoxin B wurde Pepton C/TLG in 3%iger Konzentration als Basalmedium eingesetzt, da es in allen vorherigen Versuchen am besten unter den nichtkombinierten Medien zu beurteilen war. Nach 24 Stunden zeigte das mit Maltose versetzte Medium den höchsten Enterotoxingehalt (10,0 mcg/ml). Deutlich weniger Enterotoxin als in dem zum Vergleich ohne Zusatz mitlaufenden Basalmedium (8,2 mcg/ml) wurde in den Medien mit Zusatz von Dikaliumhydrogenphosphat (5,3 mcg/ml) bzw. Magnesiumsulfat (5,6 mcg/ml) nachgewiesen (Tab. 8).

Bei der Ablesung nach 48 Stunden zeigte sich eine Verschiebung in der Rangfolge der Medien. Nur bei Zusatz von Fleischextrakt wurde mehr Enterotoxin (14,8 mcg/ml) als in der Kontrolle (13,6 mcg/ml) gebildet. Das maltosehaltige Medium erbrachte wie jenes mit Dikaliumhydrogenphosphat die schlechtesten Ergebnisse.

Die optische Dichte hatte gegenüber dem Ausgangswert nach 24 Stunden bei allen untersuchten Medien um 2,7 bzw. 2,8 zugenommen, nach 48 Stunden um 3,0 (Tab. 8).

Die nach 24 Stunden gemessenen pH-Werte lagen bei 7,3 bzw. 7,4, während nach 48 Stunden Werte von pH 7,6 bis 7,8 beobachtet wurden (Tab. 8).

Tabelle 8: Einfluß verschiedener Zusätze zu Pepton C/TLG auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Werte nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

Zusatz	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std. 48 Std.	O.D. 24 Std. 48 Std.	pH 24 Std. 48 Std.
0,2% "Lab Lemco"	8,5 14,8	2,7 3,0	7,3 7,8
0,1% K_2HPO_4	5,3 10,4	2,7 3,0	7,4 7,7
0,07% $MgSO_4$	5,6 11,2	2,7 3,0	7,4 7,7
1% Maltose	10,0 10,4	2,8 3,0	7,3 7,6
Kontrolle ohne Zusatz	8,2 13,6	2,8 3,0	7,4 7,7

Tabelle 9: Einfluß verschiedener Vitaminzusätze zu Pepton C/TLG bzw. Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

Vitaminzusatz	Medium	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std. 48 Std.	O.D. 24 Std. 48 Std.	pH 24 Std. 48 Std.
0,00005% Thiamin	Pepton Kombination	6,7	2,6	7,2
		9,6	2,6 3,0	7,3 7,6
0,001% Nicotinsäure	Pepton Kombination	6,0	2,6	7,2
		9,2	2,9 3,2	7,4 7,7
0,0001% Calcium- pantothenat	Pepton Kombination	6,6	2,6	7,3
		8,2	2,9 3,0	8,1 7,7
0,2% "Lab Lemco"	Pepton Kombination	6,2	2,6	7,2
		8,0	2,8 3,0	7,3 7,7
Kontrolle ohne Zusatz	Pepton Kombination	5,6	2,6	7,2
		8,2	2,7 3,0	7,4 7,8

Um zu ermitteln, ob und inwieweit durch Zugabe von Vitaminen zum Nährmedium eine Steigerung der Enterotoxinsynthese zu erreichen ist, wurden die Medien aus 3% Pepton C/TLG bzw. aus 2% Pepton L/ELB plus 2% neutrales Fleischpepton, die sich bei den früheren Untersuchungen bereits als gut geeignet erwiesen hatten, mit 0,00005% Thiaminiumdichlorid (Thiamin), 0,001% Nicotinsäure bzw. 0,0001% Calciumpantothenat versetzt. Der Enterotoxingehalt der vitaminhaltigen Nährmedien lag sowohl bei Pepton C/TLG als auch bei der Kombination Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton nach 24 Stunden und 48 Stunden in keinem Falle unter demjenigen der vitaminfreien Kontrollen (Tab. 9). Die besten Ergebnisse wurden mit beiden Basalmedien nach 24 Stunden und nach 48 Stunden beim Zusatz von Thiamin registriert, etwas weniger günstig war der Zusatz von Calciumpantothenat. Mit "Lab Lemco" Fleischextrakt, das sich im vorherigen Versuch als relativ gut geeigneter Zusatz erwiesen hatte, wurde weniger Enterotoxin gewonnen als mit Calciumpantothenat. In dem Kombinationsmedium - auch ohne Vitaminzusatz - wurde stets mehr Enterotoxin gebildet als in dem Medium aus Pepton C/TLG.

Die Lichtdurchlässigkeit hatte bei allen Nährböden mit Pepton C/TLG als Basalmedium nach 24 bzw. 48 Stunden jeweils gleich stark abgenommen, bei der Kombination war die Transmission beim Zusatz von Nicotinsäure jeweils am geringsten (Tab. 9).

Die Messung des pH nach 24stündiger Inkubation erbrachte bei allen Nährmedien mit Pepton C/TLG Werte von pH 7,2 bis 7,3 (Calciumpantothenat), während nach der gleichen Bebrütungszeit bei den Kombinationen Werte von pH 7,3 (Thiamin) bis 7,4 registriert wurden (Tab. 9). Nach 48 Stunden waren die

pH-Werte stets angestiegen, bei den Medien mit Pepton C/TLG auf 7,6 - 8,1 (Calciumpantothenat), bei den Mediumkombinationen auf 7,6 - 7,8 (Kontrolle ohne Vitaminzusatz).

In der nächsten Versuchsreihe wurden den beiden Nährböden aus Pepton C/TLG bzw. aus Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton Kombinationen der beschriebenen drei Vitamine zugesetzt. Nach 24 Stunden Bebrütung wurde bei den Medien mit Pepton C/TLG als Basalmedium bei Zusatz von Thiamin plus Calciumpantothenat am meisten Enterotoxin (11,0 mcg/ml) gebildet (Tab. 10), die übrigen Medien einschließlich der vitaminfreien Kontrolle enthielten annähernd gleiche Enterotoxinmengen (10,0 bis 10,3 mcg/ml). Nach 48 Stunden wurden nur bei Zusatz von Thiamin plus Nicotinsäure bzw. Thiamin, Nicotinsäure plus Calciumpantothenat größere Enterotoxinmengen (14,0 mcg/ml) als in der Kontrolle (13,4 mcg/ml) registriert. Weniger Enterotoxin als in der Kontrolle war im Medium mit Thiamin und Calciumpantothenat enthalten, das bei der ersten Ablesung (24 Std.) noch am besten beurteilt wurde.

In dem Medium aus Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton zeigten die Vitaminkombinationen aus Thiamin und Nicotinsäure bzw. aus Thiamin und Calciumpantothenat nach 24 Stunden die besten Ergebnisse (13,0 mcg/ml). Am wenigsten Enterotoxin wurde in den Medien mit Thiamin, Nicotinsäure plus Calciumpantothenat bzw. in dem Vergleichsmedium ohne Zusatz nachgewiesen. (Die Ergebnisse für den Zusatz von Nicotinsäure und Calciumpantothenat konnten aus versuchstechnischen Gründen nicht berücksichtigt werden).

Nach 48 Stunden ergab der Zusatz der Vitaminkombination Nicotinsäure/Thiamin die besten Resultate (20,0 mcg/ml),

Tabelle 10: Einfluß verschiedener kombinierter Vitaminzusätze zu Pepton C/TLG bzw. Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

Vitaminzusatz	Medium	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std. 48 Std.	O.D. 24 Std. 48 Std.	pH 24 Std. 48 Std.
0,00005% Thiamin und 0,001% Nicotinsäure	Pepton Kombination	10,3 14,0 13,0 20,0	2,9 3,0 3,0 3,6	8,1 8,9 7,7 8,2
0,00005% Thiamin und 0,0001% Calciumpantothemat	Pepton Kombination	11,0 12,6 13,0 18,0	2,8 2,9 3,0 3,2	8,4 8,8 7,5 7,8
0,001% Nicotinsäure und 0,0001% Calciumpantothemat	Pepton Kombination	10,3 13,4 — —	2,8 2,9 — —	8,5 8,7 — —
0,00005% Thiamin, 0,001% Nicotinsäure und 0,0001% Calciumpantothemat	Pepton Kombination	10,0 14,4 10,2 19,2	2,7 2,9 2,8 3,2	8,1 8,9 7,8 8,0
Kontrolle ohne Zusatz	Pepton Kombination	10,0 13,4 10,2 16,8	2,7 3,0 2,9 2,9	7,9 8,1 7,5 7,9

während nunmehr durch die Kombination Thiamin/Nicotinsäure/Calciumpantothenat der nächstbeste Enterotoxinertrag zu verzeichnen war (19,2 mcg/ml). Den geringsten Enterotoxingehalt wies das Medium ohne Vitaminzusatz auf (16,8 mcg/ml).

Die mit Pepton C/TLG bzw. Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton erzielten Ergebnisse ähneln einander insofern, als in beiden Fällen die Zugabe von Thiamin und Nicotinsäure bzw. von Thiamin, Nicotinsäure und Calciumpantothenat nach 48 Stunden zu der besten Enterotoxinausbeute führte. Nach 24 Stunden waren die Vitaminkombinationen Thiamin/Nicotinsäure bzw. Thiamin/Calciumpantothenat am günstigsten. Da die Versuche mit Pepton C/TLG bzw. Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton getrennt voneinander durchgeführt wurden, ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich.

Die optische Dichte war bei beiden Basalmedien sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden bei Zusatz von Thiamin und Nicotinsäure am stärksten angestiegen.

Die pH-Werte der Medien aus Pepton C/TLG lagen bei Zugabe von Vitaminkombinationen stärker im alkalischen (pH 8,1 - 8,5 nach 24 Std. und pH 8,7 - 8,9 nach 48 Std.) Bereich als im vitaminfreien Medium (pH 7,9 bzw. 8,1).

In der Tendenz ähnliche Resultate wurden auch mit dem Medium Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton erzielt, wenn auch bei Zugabe von Thiamin und Calciumpantothenat kaum Unterschiede zum Kontrollmedium ohne Vitaminzusatz bestanden (Tab. 10).

Tabelle 11: Einfluß des Zusatzes von Thiamin und Nicotinsäure zu verschiedenen Medien auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

Medium	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std. 48 Std.	O.D. 24 Std. 48 Std.	pH 24 Std. 48 Std.
PHP	mit Vitaminen	11,2 12,8	2,7 3,3
	ohne Vitamine	12,8 14,0	2,3 2,7
Pepton C/TLG und Pepton C/PLB	mit Vitaminen	17,0 19,4	2,9 3,3
	ohne Vitamine	9,2 12,0	2,3 2,7
PHP und Pepton C/TLG	mit Vitaminen	16,4 17,0	2,7 3,3
	ohne Vitamine	12,0 15,0	2,4 2,8
Pepton L/ELB und neutr. Fleischpepton	mit Vitaminen	17,4 20,0	2,9 3,2
	ohne Vitamine	13,0 16,4	2,3 2,8

Da durch Zugabe der Vitaminkombination Thiamin/Nicotinsäure gute Resultate erzielt wurden und sie zur Enterotoxinproduktion häufig verwendet wird, wurden diese Vitamine in der gleichen Konzentration auch anderen Medien (PHP; Pepton C/TLG plus Pepton C/PLB; PHP plus Pepton C/TLG) zugesetzt. Im Gegensatz zu den anderen Medien, wo diese Vitamine eine höhere Enterotoxinausbeute bewirkten, war bei PHP ein geringer Abfall im Vergleich zum Medium ohne Vitaminzusatz festzustellen (Tab. 11). Die besten Ergebnisse innerhalb der gesamten Versuchsreihe wurden nach 24 Stunden bei dem Medium aus Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton bei Vitaminzusatz (17,4 mcg/ml) beobachtet, ebenso nach 48 Stunden, wo die Enterotoxinausbeute 20,0 mcg Enterotoxin /ml betrug.

Bei allen vier Medien bedingte die Zugabe der Vitaminkombination nach 24 ebenso wie nach 48 Stunden eine stärkere Zunahme der optischen Dichte. Auch die pH-Werte tendierten stärker zur alkalischen Seite.

Im nächsten Versuchsabschnitt wurde mit dem Medium aus Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton als Basalmedium untersucht, ob und in welchem Ausmaß die Produktion von Enterotoxin B durch die Vitaminkonzentration beeinflusst wird. In diesen Versuchen wurden auch Pyridoxalphosphat und Biotin geprüft.

Die optimale Thiaminkonzentration war 0,005% (Tab. 12), da sowohl der Zusatz geringerer als auch größerer Mengen Thiamin weniger gute Enterotoxinausbeuten erbrachte. Die bei den vorhergehenden Versuchen angewendete Thiaminkonzentration (0,00005%) erwies sich als am wenigsten geeignet.

Die optische Dichte wies ebenfalls die höchsten Werte bei Verwendung von 0,005% Thiamin auf (3,3 bzw. 4,0). Der pH-Wert der thiaminhaltigen Nährböden erstreckte sich nach 24 Stunden von 7,3 bis 7,7, war nach 48 Stunden aber mit 7,8 bzw. 7,9 relativ gleich.

Bei der Testung der Calciumpantothenatkonzentrationen (0,0001% bzw. 0,001%) wurden, wie aus Tabelle 12 hervorgeht, nach 24 Stunden Bebrütung etwa gleich gute Ergebnisse registriert (8,1 bzw. 7,8 mcg/ml), während nach 48 Stunden bei Einsatz der niedrigeren Konzentration die größere Enterotoxinmenge erreicht wurde (11,6 mcg/ml gegenüber 10,4 mcg/ml). Hinsichtlich der optischen Dichte wurden keine, hinsichtlich des pH-Wertes nur nach 48 Stunden geringe Unterschiede beobachtet.

Bei Zusatz von Pyridoxalphosphat in 0,001%iger bzw. 0,002%-iger Konzentration (Tab. 12) wurde nach 24stündiger Inkubation in dem Medium mit dem geringeren Vitaminzusatz nur ein etwas besserer, nach 48 Stunden jedoch ein deutlich besserer Enterotoxinertrag erzielt (12,0 mcg/ml gegenüber 10,4 mcg/ml).

Die Werte für die optische Dichte und Wasserstoffionenkonzentration lagen jeweils in dem Medium mit 0,001% Pyridoxalphosphat etwas höher. Auffällig war, daß der pH-Wert bereits nach 24 Stunden über 8,0 angestiegen war (Tab. 12).

Bei Biotin, von dem ebenso wie von Calciumpantothenat Konzentrationen von 0,0001% bzw. 0,001% getestet wurden, wurde mit der geringeren Vitaminmenge sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden etwas mehr Enterotoxin produziert (Tab. 12). Die bei der Ermittlung der optischen Dichte erhaltenen Werte unterschieden sich bei den beiden Vitaminkonzentrationen

Tabelle 12: Einfluß des Zusatzes von Vitaminen unterschiedlicher Konzentration zu

Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

Vitamin	Konzentration	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std. 48 Std.	O.D. 24 Std. 48 Std.	pH 24 Std. 48 Std.
Thiamin	0,00005%	8,2	2,9	7,3
	0,00005%	9,2	3,0	7,7
	0,0005%	10,0	3,3	7,7
	0,005%	9,5	3,0	7,4
Calciumpanthothenat	0,0001%	8,1	2,7	7,3
	0,001%	7,8	2,7	7,3
Pyridoxalphosphat	0,001%	8,5	2,3	8,5
	0,002%	8,2	2,1	8,3
Biotin	0,0001%	6,7	2,8	7,4
	0,001%	6,4	2,8	7,6
ohne Vitaminzusatz		6,0	2,9	8,2

nur nach 48 Stunden Bebrütung geringgradig, die pH-Werte des vitaminreicheren Mediums waren stets etwas alkalischer (Tab. 12).

Der Vergleich der in dem gesamten Versuch erzielten Enterotoxinmengen/ml zeigt, daß die beste Enterotoxinausbeute bei Zusatz von 0,005% Thiamin erhalten wurde. Im übrigen erwiesen sich alle geprüften Thiaminkonzentrationen nach 48 Stunden als besser als die gleichzeitig geprüften Vitamine Calciumpantothenat, Pyridoxalphosphat oder Biotin. Der Unterschied zur vitaminfreien Kontrolle, mit der am wenigsten Enterotoxin im Rahmen dieser Versuchsreihe gewonnen wurde, war bei Zusatz von Biotin am geringsten.

Aufbauend auf die Ergebnisse des Versuches zur Bestimmung der optimalen Vitaminkonzentration, wurden abschließend noch zwei Versuchsreihen mit Vitaminkombinationen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurde Thiamin (0,005%) mit anderen Vitaminen kombiniert, in der zweiten Pyridoxalphosphat (0,001%). Nach 24 Stunden hatte sich am meisten Enterotoxin in dem Basalmedium mit Thiamin ohne weitere Vitamine (14,0 mcg/ml) gebildet (Tab. 13). Etwas weniger gute Resultate bewirkte der Zusatz von Thiamin/Calciumpantothenat zum Basalmedium (12,8 mcg/ml), während die Kombination Thiamin/Nicotinsäure/Calciumpantothenat deutlich abfiel (10,4 mcg/ml). Auch nach 48stündiger Bebrütung war der Enterotoxingehalt in dem Kontrollmedium am höchsten (24,0 mcg/ml), am wenigsten Enterotoxin wurde bei der Vitaminkombination Thiamin/Biotin (16,4 mcg/ml) festgestellt. Die Kombinationen Thiamin/Nicotinsäure, Thiamin/Nicotinsäure/Calciumpantothenat bzw. Thiamin/Pyridoxalphosphat erbrachten mit 20 mcg/ml im Rahmen dieser Versuche mittlere Erträge.

Tabelle 13: Einfluß verschiedener mit Thiamin kombinierter Vitamine zu Pepton L/ELB plus
neutrales Fleischpepton auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische
Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

Vitaminskombination	Enterotoxin (mcg/ml)		O.D.		pH	
	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.
0,005% Thiamin/0,001% Nicotinsäure	12,8	20,0	3,0	3,6	7,7	8,2
0,005% Thiamin/0,0001% Calcium- pantothenat	12,8	18,4	3,0	3,2	7,5	7,8
0,005% Thiamin/0,001% Nicotinsäure/ 0,0001% Calciumpantothenat	10,4	20,0	2,8	3,2	7,4	7,8
0,005% Thiamin/0,0001% Biotin	12,0	16,4	3,0	3,6	7,7	8,1
0,005% Thiamin/0,001% Pyridoxalphosphat	12,0	20,0	2,9	3,4	7,6	8,0
0,005% Thiamin (Kontrolle)	14,0	24,0	3,2	3,9	7,7	7,9

Für die optische Dichte wurden nach 24 Stunden Werte von 2,8 (Thiamin/Nicotinsäure/Calciumpantothenat) bis 3,2 (Thiamin) registriert (Tab. 13). Auch nach 48 Stunden war der Anstieg der optischen Dichte am höchsten bei dem Kontrollmedium (3,9), bei den anderen Medien lag er zwischen 3,2 (Thiamin/Nicotinsäure/Calciumpantothenat) und 3,6. Die Messung der pH-Werte ergab bei der ersten Ablesung für alle Medien Werte zwischen pH 7,7 (Thiamin/Nicotinsäure; Thiamin/Biotin; Kontrollmedium). Nach 48 Stunden reagierte das Medium mit Thiamin/Calciumpantothenat am stärksten alkalisch (pH 8,2), die übrigen pH-Werte lagen zwischen 7,8 (Thiamin/Calciumpantothenat; Thiamin/Nicotinsäure/Calciumpantothenat) und 8,1.

Pyridoxalphosphat wurde nur mit Calciumpantothenat, Thiamin oder Nicotinsäure kombiniert. Am meisten Enterotoxin (Tab. 14) wurde nach 24 Stunden in dem Medium mit Pyridoxalphosphat und Calciumpantothenat gewonnen (24,0 mcg/ml), am wenigsten Enterotoxin enthielt das zum Vergleich mitlaufende Medium mit 0,005% Thiamin (17,0 mcg/ml). Nach weiteren 24 Stunden wurden gleich hohe Enterotoxinmengen (41,0 mcg/ml) bei Zusatz von Pyridoxalphosphat und Calciumpantothenat bzw. Thiamin (Kontrolle) nachgewiesen.

Die Werte für die optische Dichte hatten nach 24 Stunden um 3,0 bis 3,3 zugenommen, nach 48 Stunden ergab sich - mit Ausnahme des Mediums, das die Kombination Pyridoxalphosphat/Nicotinsäure enthielt - ein Anstieg der Extinktionswerte auf 3,9 (Tab. 14).

Der niedrigste pH-Anstieg wurde nach 24 Stunden bei dem Kontrollmedium (pH 7,5), der stärkste Anstieg bei dem Medium mit

Tabelle 14: Einfluß verschiedener mit Pyridoxalphosphat kombinierter Vitamine zu Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

Vitaminskombination	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std. 48 Std.	O.D. 24 Std. 48 Std.	pH 24 Std. 48 Std.
0,001% Pyridoxalphosphat/ 0,0001% Calciumpanthothenat	24,0 41,0	3,3 3,9	7,9 8,2
0,001% Pyridoxalphosphat/ 0,005% Thiamin	20,0 37,0	3,2 3,9	8,0 8,0
0,001% Pyridoxalphosphat/ 0,001% Nicotinsäure	18,4 33,0	3,0 3,8	7,9 8,1
0,005% Thiamin (Kontrolle)	17,0 41,0	3,0 3,9	7,5 8,0

Pyridoxalphosphat/Thiamin (pH 8,0) abgelesen. Nach 48 Stunden betrug der pH-Wert in allen Medien mindestens 8,0, am stärksten alkalisch reagierte die Bouillon, der die Vitamine Pyridoxalphosphat und Calciumpantothenat zugesetzt worden waren (pH 8,2).

Da in der vorhergehenden Versuchsreihe der Zusatz von 0,005% Thiamin zu Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton die besten Resultate erbrachte, in dieser Versuchsreihe nach 24 Stunden - in einer zusätzlichen auch nach 48 Stunden - aber mit der Kombination 0,001% Pyridoxalphosphat und 0,0001% Calciumpantothenat bessere Ergebnisse als mit 0,005% Thiamin erzielt wurden, wurde für die folgenden Versuche dieser Vitaminkombination der Vorrug gegeben.

3.3.3. Einfluß des pH-Wertes

Zur Ermittlung des Anfangs-pH, der für die Enterotoxin B-Synthese optimal ist, wurde im ersten Versuchsabschnitt das Medium aus 2% Pepton L/ELB plus 2% neutralem Fleischpepton mit Zusatz von 0,0001% Calciumpantothenat und 0,001% Pyridoxalphosphat auf pH 6,5; 7,0; 7,5 bzw. 8,0 eingestellt. Von den geprüften pH-Werten erwies sich derjenige von 7,0 bei beiden Inkubationszeiten als am günstigsten im Hinblick auf die Enterotoxinbildung (Tab. 15). Etwas schlechter war die Enterotoxinausbeute bei pH 7,5, während bei pH 8,0 die geringsten Enterotoxinmengen registriert wurden. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde das gleiche Medium danach auf den pH-Bereich von 6,8 - 7,8 mit Abstand von 0,2 pH eingestellt. Dabei zeigte sich, daß bei einem Ausgangs-pH von 7,0 am meisten Enterotoxin gebildet wurde und die pH-Werte von 7,2 bzw. 6,8 am zweitgünstigsten waren

Tabelle 15: Einfluß des pH-Wertes von Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton *) auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

pH-Wert des Mediums	Enterotoxin (mcg/ml)		O.D.		pH	
	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.
6,5	8,2	10,0	2,9	2,9	7,3	7,8
7,0	9,4	18,5	2,8	2,9	7,3	7,6
7,5	9,0	16,5	2,7	2,9	7,2	7,6
8,0	7,8	9,4	2,7	2,9	7,1	7,7
6,8	8,2	15,0	2,8	2,9	7,3	7,9
7,0	8,8	16,0	2,8	2,9	7,2	7,7
7,2	8,5	14,5	2,8	2,9	7,5	7,8
7,4	8,2	14,0	2,7	2,9	7,2	7,7
7,6	8,0	11,2	2,8	2,9	7,4	7,7
7,8	7,0	9,6	2,8	2,9	7,5	7,8

*) unter Zusatz von 0,0001% Calciumpantothenat und 0,001% Pyridoxalphosphat

(Tab. 15). Am wenigsten Enterotoxin wurde gefunden, als das Medium auf pH 7,8 eingestellt wurde. Zum Vergleich lief auch das Medium mit 0,005% Thiamin anstelle der Vitaminkombination Calciumpantothenat/Pyridoxalphosphat mit. Auch hiermit ergab sich, daß in dem Medium mit dem Anfangs-pH von 7,0 am meisten Enterotoxin produziert wurde. Allerdings lagen die Werte stets unter jenen für das Medium mit Calciumpantothenat und Pyridoxalphosphat als Zusatz. Auf eine tabellarische Darstellung der Ergebnisse wurde daher verzichtet.

Die Lichtdurchlässigkeit war bei der ersten Ablesung am niedrigsten beim Anfangs-pH von 6,5 (O.D. 2,9), während nach 48 Stunden Bebrütung keine pH-abhängigen Unterschiede gefunden wurden. Im Hauptteil dieses Versuchs wurden sowohl nach 24 Std. als auch nach 48 Std. jeweils gleich hohe Werte registriert. Die pH-Werte waren im ersten Teilversuch beim sauren bzw. neutralen Medium nach 24 Std. jeweils auf pH 7,3 angestiegen, bei den beiden alkalischen Medien aber auf pH 7,1 - 7,2 abgesunken (Tab. 15). Nach 48 Std. Inkubation waren pH-Werte von 7,6 - 7,8 erreicht, wobei der höchste pH-Wert in dem anfänglich auf pH 6,5 eingestellten Medium beobachtet wurde. Im zweiten Versuchsabschnitt kam es nach 24 Std. bis zu einem Anfangs-pH von 7,2 zu einem Anstieg des pH-Wertes, bei höherem Anfangs-pH zu einer Abnahme. Nach 48 Std. waren keine erheblichen Differenzen in den pH-Werten (7,7 - 7,9) zu beobachten (Tab. 15).

Im nächsten Versuchsabschnitt wurde zum Vergleich auch der Einfluß des pH (6,5; 7,0; 7,5 bzw. 8,0) bei Verwendung von Pepton C/TLG anstatt des kombinierten Mediums getestet. Das auf pH 7,0 eingestellte Medium bildete im Vorversuch ebenfalls sowohl nach 24 Std. als auch nach 48 Std. Inkubation

Tabelle 16: Einfluß des pH-Wertes von Pepton C/TLG auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

pH-Wert des Mediums	Enterotoxin (mcg/ml)		O.D.		pH	
	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.
6,5	7,0	10,4	2,7	3,0	7,1	8,2
7,0	8,4	12,5	2,7	3,0	7,1	7,7
7,5	8,0	11,0	2,7	3,0	7,2	7,9
8,0	7,4	10,6	2,6	2,8	7,3	8,0
6,8	8,0	13,6	2,7	2,8	8,1	8,5
7,0	8,6	14,0	2,6	2,8	7,9	8,4
7,2	8,2	14,0	2,7	2,8	8,0	8,5
7,4	8,0	13,6	2,8	2,8	8,1	8,5
7,6	8,0	10,4	2,8	2,8	8,1	8,5
7,8	6,8	9,2	2,7	2,8	8,2	8,6

die größten Enterotoxinmengen (Tab. 16). Nach 24 und nach 48 Std. ergab das Medium mit dem Anfangs-pH von 6,5 die schlechteste Enterotoxinausbeute, während das auf pH 7,5 eingestellte Medium jenem von 7,0 nur geringgradig unterlegen war. Im daran anschließenden Hauptversuch war die Enterotoxinausbeute wiederum in dem auf pH 7,0 eingestellten Medium am größten (Tab. 16). Das Medium mit einem Anfangs-pH von 7,2 erbrachte nach 24 Std. etwas geringere Enterotoxinmengen, war aber nach 48 Std. dem Medium mit neutralem pH gleichwertig. Die geringste Enterotoxinbildung fand bei dem auf pH 7,8 eingestellten Medium statt.

Die optische Dichte nahm im Vorversuch außer im auf pH 8,0 eingestellten Medium im gleichen Umfang zu. Dieses Medium zeigte eine stärkere Lichtdurchlässigkeit. Im Hauptversuch waren nach 48 Std. keine Unterschiede zu verzeichnen, nach 24 Std. war die optische Dichte bei den auf pH 7,4 und 7,6 eingestellten Medien am größten (Tab. 16).

Der pH-Wert betrug nach 24 Std. 7,1 (Anfangs-pH 6,5 bzw. 7,0), 7,2 (Anfangs-pH 7,5) und pH 7,3 (Anfangs-pH 8,0). Nach 48 Std. zeigte das auf pH 6,5 eingestellte Medium mit pH 8,2 den stärksten Anstieg, am niedrigsten lag der pH-Wert bei Einstellung auf pH 7,0 (pH 7,7). Die nach 24 bzw. 48 Std. gemessenen pH-Werte des Hauptversuches waren beim Medium mit dem Anfangs-pH von 7,0 am geringsten (Tab. 16). Die Unterschiede im End-pH der auf verschiedene Anfangs-pH-Werte eingestellten Medien waren jedoch nur sehr gering.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde geprüft, ob die Enterotoxinproduktion durch Verwendung gepufferter Medien von Pepton C/TLG mit einem Anfangs-pH von 6,8; 7,0 bzw. 7,2

Tabelle 17: Einfluß des pH-Wertes von Pepton C/TLG (gepuffert) auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei 37°C

pH-Wert	Molare Konzentration des Phosphatpuffers	Enterotoxin (mcg/ml)		O.D.		pH
		24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.	
6,8	0,005 m	7,0	16,8	2,2	2,3	7,2
	0,01 m	6,8	14,0	2,0	2,1	7,5
	0,1 m	3,3	5,3	1,9	2,0	7,0
	Kontrolle	7,4	18,4	2,2	2,3	8,0
7,0	0,005 m	7,8	17,2	2,1	2,2	8,0
	0,01 m	7,0	15,8	2,1	2,1	7,7
	0,1 m	4,8	6,5	2,0	2,1	7,0
	Kontrolle	8,2	20,0	2,1	2,2	8,1
7,2	0,005 m	7,4	13,0	2,0	2,4	7,8
	0,01 m	4,8	9,2	1,9	2,1	7,8
	0,1 m	2,9	4,7	1,8	1,9	7,2
	Kontrolle	7,8	17,2	2,0	2,3	8,0

günstig beeinflusst wird. Dabei stellte sich heraus (Tab. 17), daß bei allen drei Anfangs-pH-Werten am meisten Enterotoxin in der ungepufferten Kontrolle gebildet wurde. Mit Zunahme der molaren Konzentration des Puffers nahm die Enterotoxinausbeute jeweils ab. Den höchsten Enterotoxinertrag innerhalb der gesamten Versuchsreihe ergab nach 24 und 48 Std. Inkubationszeit das auf pH 7,0 eingestellte ungepufferte Medium, den geringsten das auf pH 7,2 eingestellte Medium, das mit 0,1 molarem Puffer hergestellt worden war.

Die Lichtdurchlässigkeit nahm nach 24 Std. bei allen drei pH-Einstellungen des Mediums am stärksten bei dem ungepufferten bzw. am geringsten gepufferten Medium, am wenigsten in der am stärksten gepufferten Bouillon ab. Die nach 24 bzw. 48 Std. gemessenen pH-Werte betrugen in den ungepufferten Medien mindestens 8,0, während unter den gepufferten Medien nur mit dem mit 0,005 m Phosphatpuffer hergestellten und auf pH 7,0 eingestellten Medium ein Wert über 8,0 registriert wurde (Tab. 17). Der geringste Anstieg wurde in den in 0,1 m Puffer gelösten Medien verzeichnet, die Zunahme gegenüber dem Anfangswert betrug nach 48 Std. nur 0,1 bis 0,2 pH.

Aufgrund der in diesem Versuchsabschnitt über den Einfluß des Anfangs-pH auf die Enterotoxinausbeute ermittelten Ergebnisse wurden die Medien in den weiteren Versuchsreihen auf pH 7,0 eingestellt.

3.3.4. Einfluß unterschiedlicher Belüftung des Mediums

Zur Klärung der Frage, inwieweit eine Belüftung des Mediums eine Verbesserung der Enterotoxinproduktion bewirken kann, wurde abschließend geprüft, welchen Einfluß Schüttelgeschwindigkeit, Verhältnis von Nährbodenmenge zu Gefäßvolumen bzw. direkte Zufuhr von Gasen haben.

Aus versuchstechnischen Gründen konnten bei der Prüfung des von der Schüttelgeschwindigkeit abhängigen Effekts jeweils nur zwei Proben von jedem der getesteten Medien (PHP, Pepton C/TLG bzw. Kombination Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton mit Zusatz von Calciumpantothenat und Pyridoxalphosphat) parallel laufen. Zur Ausschaltung rein zufallsbedingter Ergebnisse wurden die Versuche jeweils zweimal durchgeführt. Tabelle 18 enthält die Mittelwerte dieser Bestimmungen. Die Erhöhung der Umdrehungszahl des "Gyrotory-Shakers" von 100 über 150, 280 auf 350 U/min führte innerhalb der 24 Std. betragenden Versuchsdauer bei allen Medien zu einer Steigerung der Enterotoxinbildung. In den Medien aus PHP sowie aus Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton wurde nach 24 Std. Bebrütung bei 350 U/min mehr als die doppelte Menge Enterotoxin gebildet als bei 100 U/min (Tab. 18). Bei dem Medium aus Pepton C/TLG machte die Steigerung nicht ganz 100% aus. In zur Kontrolle mitlaufenden Proben, die nicht geschüttelt wurden, war selbst nach 48 Std. noch keine Enterotoxinbildung nachweisbar. Ein Vergleich der Enterotoxinausbeuten in den drei Medien bei den jeweiligen Schüttelgeschwindigkeiten zeigt, daß die Enterotoxinsynthese in der Kombination aus Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton am besten und in PHP am schlechtesten war.

Die stärkste Zunahme der optischen Dichte wurde für Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton bei 280 bzw. 350 U/min verzeichnet (jeweils 2,9). Bei beiden Medien betrug sie bei 100 bzw. 150 U/min nur 2,6 Einheiten. Pepton C/TLG wies die geringste Lichtdurchlässigkeit bei Inkubation mit 280 U/min auf, die höchste Lichtdurchlässigkeit wurde bei 100 U/min gemessen.

Tabelle 18: Einfluß verschiedener Schüttelgeschwindigkeiten (U/min) der Medien PHP, Pepton C/TLG bzw. Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton (= L/ELB)*) auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 Stunden Bebrütung bei 37°C

U/min	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std.				O.D. 24 Std.				pH 24 Std.	
	PHP	C/TLG	L/ELB		PHP	C/TLG	L/ELB		PHP	C/TLG L/ELB
100	4,0	5,8	6,4		2,6	2,6	2,6		7,0	7,7 7,4
150	4,5	7,0	7,4		2,6	2,7	2,6		7,0	7,7 7,1
280	7,0	8,5	10,0		2,9	2,8	2,9		7,1	7,4 7,3
350	9,2	10,2	16,6		2,9	2,7	2,9		7,3	7,4 7,7

*) siehe Tabelle 15.

Neutrale Reaktion (pH 7,0) zeigte das Medium aus PHP bei 100 und 150 U/min, am stärksten zum alkalischen Bereich tendierte das bei 350 U/min bebrütete Medium (pH 7,3). Hingegen war bei den mit 100 bzw. 150 Umdrehungen inkubierten Medien aus Pepton C/TLG der pH-Wert stärker alkalisch (pH 7,7) als bei den mit höheren Umdrehungszahlen bebrüteten Nährmedien (pH 7,4). Das Medium aus Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton zeigte den geringsten pH-Anstieg bei Inkubation mit 150 U/min (pH 7,1). Bebrütung bei 350 U/min verursachte die stärkste Zunahme des pH-Wertes (pH 7,7). Bei Messung des pH der statischen Kultur wurde nach 24 bzw. 48 Std. ein pH von 7,2 registriert.

Das für die Enterotoxinbildung günstigste Verhältnis zwischen Menge des Mediums und Volumen des Kulturgefäßes wurde am Medium aus 2% Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton (mit Zusatz von 0,0001% Calciumpantothenat und 0,001% Pyridoxalphosphat) erprobt. Die Medien wurden in Mengen von 50, 100, 200 bzw. 400 ml in 2 l-Erlenmeyerkolben bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 U/min 48 Std. lang bebrütet. Die erste Ablesung nach 24 Std. (Tab. 19) ergab gleich gute Ergebnisse bei Verwendung von 100 bzw. 200 ml Medium (16,0 mcg Enterotoxin/ml). In dem 50 ml Medium enthaltenden Erlenmeyerkolben fand die geringste Enterotoxinbildung statt (8,5 mcg/ml). Die eindeutig höchsten Enterotoxinerträge wurden nach 48 Std. beim Einsatz von 200 ml Medium gemessen (Tab. 19). Ebenso erwies sich auch bei dieser Ablesung die geringste geprüfte Nährbodenmenge (50 ml) als am wenigsten geeignet, während in 400 ml Medium die zweithöchste Enterotoxinausbeute erzielt wurde.

Mit abnehmender Mediummenge kam es zum Anstieg der optischen Dichte und der pH-Werte (Tab. 19).

Tabelle 19: Einfluß der Nährbodenmenge Pepton L/ELB plus
neutrales Fleischpepton^{*)} bei Verwendung von
2 l-Erlenmeyerkolben auf die Bildung von Entero-
toxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und
pH-Wert nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung bei
37°C

Nährboden- menge	Enterotoxin (mcg/ml) ^{**)}		O.D. ^{**)}		pH ^{**)}	
	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.
50 ml	8,5	9,2	3,2	3,2	8,4	8,6
100 ml	16,0	18,0	3,2	3,2	8,0	8,4
200 ml	16,0	20,0	3,0	3,0	7,7	8,3
400 ml	10,4	18,5	2,9	3,0	7,4	8,2

^{*)} siehe Tabelle 15.

^{**)} Mittelwert zweier Versuche

Tabelle 20: Einfluß der Einleitung verschiedener Gase in Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton*) auf die Bildung von Enterotoxin B (mcg/ml), optische Dichte (O.D.) und pH-Wert nach 24 Stunden Bebrütung bei 37°C

Gas	Enterotoxin (mcg/ml) 24 Std.	O.D. 24 Std.	pH 24 Std.
N ₂	0,0	1,1	6,6
O ₂	11,2	2,9	6,9
CO ₂	2,3	2,1	6,4
Kontrolle	5,0	2,6	6,9

*) siehe Tabelle 15.

Der Einfluß der Einleitung verschiedener Gase in das Nährmedium wurde ebenfalls mit dem Medium aus Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton unter Zusatz von 0,0001% Calciumpantothenat und 0,001% Pyridoxalphosphat geprüft. Aus Tabelle 20 geht hervor, daß nach 24 Std. die höchsten Enterotoxinmengen (mehr als das Doppelte der Kontrolle) in der Bouillon, die mit Sauerstoff belüftet wurde, erzielt wurde (11,2 mcg/ml). Relativ wenig Enterotoxin (2,3 mcg/ml) wurde gebildet, wenn Kohlendioxyd eingeleitet wurde und gar nichts, wenn Stickstoff zugeführt wurde.

Die optische Dichte nahm am stärksten in der mit Sauerstoff versorgten Bouillon zu, am wenigsten bei Stickstoffzufuhr (Tab. 20).

Mit pH 6,9 wiesen das unter erhöhter Sauerstoffspannung stehende Medium sowie das nicht direkt belüftete Kontrollmedium die höchsten pH-Werte auf, den niedrigsten pH ergab das Nährmedium, dem Kohlendioxyd zugeführt wurde (6,4).

4. Diskussion

Für einen zuverlässigen serologischen Nachweis von Staphylokokkenenterotoxin sind gereinigte Antigene (Enterotoxin) und Antikörper (Antienterotoxin) unbedingt erforderlich. Augenblicklich sind diese Reagenzien jedoch nur in begrenztem Umfange verfügbar - von der Firma Serva (Heidelberg) werden die Typen A, B, C, D und E kommerziell vertrieben, von der Firma Makor (Jerusalem) speziell der Typ B - und darüber hinaus auch sehr teuer. Primär ist dafür der Mangel an Antigen verantwortlich, das erst mittels sehr aufwendiger Reinigungsverfahren und unter z.T. erheblichem Substanzverlust aus dem Rohtoxin gewonnen wird. Aus diesem Grund sind für die Produktion von Rohtoxin kulturelle Verfahren wünschenswert, die aufgrund hoher Ergiebigkeit eine rationelle Herstellung von Enterotoxin ermöglichen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher versucht werden, optimale Bedingungen für die Produktion großer Mengen von Enterotoxin B hinsichtlich Nährmedium und anderer Faktoren (z.B. pH-Wert, Schüttelgeschwindigkeit des Brutschrankes, Einleitung von Gasen, Verhältnis von Nährbodenmenge zu Gefäßvolumen) zu ermitteln. Auf die Durchführung der anfänglich geplanten entsprechenden Untersuchungen zur Produktion von Enterotoxin A wurde verzichtet, da dem Institut zu dem Zeitpunkt keine Staphylokokkenkultur mit gutem Enterotoxinbildungsvermögen (über 10 mcg/ml nach WEIGS und ROBBINS, 1970) zur Verfügung stand und somit eine Aussage über die Eignung der Medien unter Zuhilfenahme des Oudin-Tests, dessen Nachweisgrenze bei 1 mcg Enterotoxin/ml liegt (ANGELOTTI, 1969; BERGDOLL, 1970 und 1972; HALL et al., 1963 und 1965) kaum möglich gewesen wäre.

Als Kultur wurde *Staphylococcus aureus* S-6 gewählt, dessen Enterotoxinbildungsvermögen allerdings - wie Vorversuche gezeigt hatten - infolge wiederholter Überimpfungen auf Schrägagar schon eingeschränkt war und im Verlauf der Untersuchungen noch weiter abnahm. Aus diesem Grund mußten auch bei der Auswertung die Ergebnisse jeder Versuchsreihe für sich bewertet werden, während die absoluten Enterotoxinsmengen/ml Medium in den verschiedenen Versuchsreihen nicht direkt miteinander verglichen werden konnten. Rückschlüsse auf die Eignung der in den verschiedenen Versuchsreihen getesteten Medien wurden aber dadurch ermöglicht, daß ein zuvor geprüftes Medium (z.B. aus 3% Pepton C/TLG oder aus 2% Pepton L/ELB plus 2% neutralem Fleischpepton) stets zum Vergleich mitlief. Die Züchtung der Staphylokokken wurde im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit nur in flüssigen Medien (Schüttelkulturen) vorgenommen, da aufgrund der größeren Nährbodenmenge insgesamt auch mehr Enterotoxin pro Ansatz produziert werden kann als mit der "sac-culture"-Technik (CASMAN und BENNETT, 1963; DONNELLY et al., 1967) oder ähnlichen Verfahren (HALLANDER, 1965; MINOR und MARTH, 1972 b), die eine höhere Ausbeute pro ml Medium erbringen (HALLANDER, 1965; JARVIS und LAWRENCE, 1970).

Da bei Verwendung möglichst einfacher Nährmedien das Toxin anschließend schneller und leichter gereinigt werden kann als bei Produktion in komplexen Medien (BERGDOLL, 1970), wurden Medien der letztgenannten Art mit Ausnahme von Hirn-Herz-Medium nicht in die Untersuchungen miteinbezogen. Hirn-Herz-Medium lief anfänglich zum Vergleich mit, da es nach Angaben von CASMAN und BENNETT (1963) eine bessere Enterotoxinausbeute (Typ A) ermöglichte als das Proteinhydrolysat Edamin S. Diese Resultate konnten für den Typ B insofern bestätigt werden, als in der auf pH 7,4 eingestellten Hirn-Herz-Bouillon deutlich mehr Enterotoxin/ml produziert wurde als in 3% Pepton L/ELB (= Edamin S). Mit drei der restlichen 17 geprüften Proteinhydrolysate, und zwar Pepton C/TLG (= Enzamin AS), neutralem Fleischpepton (Oxoid) sowie Pepton L/ELB (= Edamin), wurde jedoch noch mehr Enterotoxin/ml gewonnen. Hierauf könnte auch zurückzuführen sein,

daß HALLANDER (1965) mit einem Casein-Hydrolysat-Medium (ohne nähere Angaben) mehr Enterotoxin produzieren konnte als mit Hirn-Herz-Medium. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß zwischen den Produkten verschiedener Hersteller (REISER und WEISS, 1969), aber auch - wie eigene Untersuchungen zeigten - verschiedenen Chargen des gleichen Herstellers erhebliche Unterschiede bestehen können (20 mcg bzw. 7 mcg Enterotoxin B/ml). Diese Differenzen wurden bei verschiedenen Chargen der häufiger getesteten Proteinhydrolysate nicht beobachtet. Aufgrund der geringen und stark schwankenden Leistungsfähigkeit sowie der komplexen, die Reinigung des Rohtoxins erschwerenden Zusammensetzung wurde in späteren Versuchsreihen auf die Anwendung dieses Mediums verzichtet. Zum routinemäßigen Nachweis des Enterotoxinbildungsvermögens von *Staphylococcus aureus*-Stämmen, z.B. mit der von DONNELLY et al. (1967) empfohlenen "sac-culture"-Technik, kann das auch für andere Zwecke gut geeignete Hirn-Herz-Medium ohne weiteres eingesetzt werden, wenn ergiebiger Proteinhydrolysate nicht zur Verfügung stehen.

Bei den vergleichenden Untersuchungen von 18 Proteinhydrolysaten verschiedener Hersteller fiel auf, daß Protein Hydrolysate Powder (PHP), das von BERGDOLL (1962), KATO et al. (1966), REISER und WEISS (1969) für diese Zwecke allein oder in Kombination mit N-Z Amine A bzw. N-Z Amine NAK empfohlen wurde, nicht die höchsten Enterotoxinkonzentrationen erbrachte. Es wurden vielmehr mit dem von den obengenannten Autoren vermutlich nicht getesteten Serva-Pepton C/TLG (= Enzamin AS), neutralen Fleischpepton (Oxoid), Serva-Pepton L/ELB (= Edamin), sowie Serva-Pepton C/ELB (= Peptidase) - selbst unter Berücksichtigung kleiner Ungenauigkeiten beim Ablesen der Breite der Präzipitationsbanden mit Hilfe einer Schublehre - deutlich bessere Enterotoxinausbeuten erzielt. Besonders groß war dabei die Differenz zwischen PHP und Pepton C/TLG, in dem nach 24 Std. etwa die doppelte Menge, nach 48 Std. etwa die vier- bis fünffache Menge nachweisbar war. Die von den erwähnten

Autoren als Zusatz zu PHP empfohlenen N-Z Amine A bzw. NAK konnten infolge einer Fehlinformation seitens des Herstellers, die erst bei der schriftlichen Abfassung der Arbeit infolge nochmaliger Nachfrage bekannt wurde, nicht auf ihre Eignung geprüft werden. Ähnlich umfangreiche Vergleiche verschiedener Proteinhydrolysate sind bisher nur von VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI (1973) angestellt worden. Diese Autoren kamen, wie aus der Gegenüberstellung in Tabelle 21 ersichtlich wird, zu einer anderen Rangfolge hinsichtlich der Eignung der Medien. So waren nach VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI (1973) vier Medien deutlich, ein weiteres etwas leistungsfähiger als das nach eigenen Untersuchungen stets optimale Serva-Pepton C/TLG, das dem N-Z Amine AS entspricht. Andererseits war das unter den acht aufgeführten Proteinhydrolysaten am schlechtesten zu beurteilende Serva-Pepton C/HSK als Hy-case Amino bei VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI (1973) nur schlechter als Edamine S bzw. PHP. Übereinstimmung bestand nur insofern, als in Serva-Pepton L/ELG (Edamine S) von beiden Untersuchungsstellen mehr Enterotoxin gefunden wurde als in PHP. Die Ursachen für diese z.T. erheblichen Unterschiede sind nicht bekannt. Möglicherweise waren aufgrund des Zusatzes von Nicotinsäure, Pantothenat, Thiamin sowie Biotin in den einzelnen Proteinhydrolysaten (VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI, 1973) veränderte Wachstumsbedingungen im Vergleich zu den einfachen Medien (ohne Vitaminzusatz) geschaffen worden. Weniger wahrscheinlich dürfte sein, daß auch - trotz des gleichen Namens der Produkte der Firmen Serva (Heidelberg) bzw. Sheffield Chemical (Norwich, USA) - Unterschiede in der Zusammensetzung der Proteinhydrolysate selbst bestanden. Andererseits ist auch daran zu denken, daß die Differenzen zu den Ergebnissen von VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI (1973) dadurch bedingt sind, daß bei den eigenen Versuchen eine Kultur von Staphylococcus aureus S-6 zum Einsatz kam, deren Enterotoxinbildungsvermögen

Tabelle 21: Gegenüberstellung der Ergebnisse vergleichender Untersuchungen im Hinblick auf die Eignung von Proteinhydrolysaten zur Produktion von Enterotoxin B

Medium	Enterotoxin: mcg/ml und Rangfolge ()	
	Eigene Untersuchungen	VANDENBOSCH, FUNG* u. WIDOMSKI (1973)
C/TLG (Serva Pepton) N-Z Amine AS	50,0 (1.)	127 (6.)
L/ELG (Serva Pepton) (Edamine S)	13,4 (2.)	305 (1.)
PHP	10,4 (3.)	250 (2.)
S/ELB (Serva Pepton) (Soy Peptone)	10,0 (4.)	130 (5.)
C/ESX (Serva Pepton) (NZ-case)	5,0 (5.)	69 (8.)
C/HSH (Serva Pepton) (Hy-case Amino)	3,4 (6.)	165 (4.)
C/HSF (Serva Pepton) (Hy-case SF)	3,2 (7.)	70 (7.)
C/HSH (Serva Pepton) (Hy-case Amino)	0,0 (8.)	203 (3.)

* Alle Medien mit Zusatz von Nicotinsäure, Pantothanat, Thiamin und Biotin.

infolge häufiger Überimpfungen - wie auch von BERGDOLL (1972) beschrieben wurde - erheblich abgenommen hatte. Es ist daher nicht auszuschließen, daß die Anforderungen der verwendeten Kultur an die Nährbodenzusammensetzung andere sind als die von Kulturen mit deutlich besserem Enterotoxinbildungsvermögen.

Der Versuch, die Enterotoxinausbeuten durch Kombination von jeweils zwei für die Enterotoxinproduktion gut geeigneten Proteinhydrolysaten zu steigern, erbrachte nur in einem Falle (Serva Pepton L/ELB plus neutrales Fleischpepton) einen deutlichen Vorteil gegenüber dem bis dahin als optimal angesehenen Medium aus 3% Serva Pepton C/TLG. Auffälligerweise wurde in Mediumkombinationen, deren einer Bestandteil 3% Serva-Pepton C/TLG war, nicht eindeutig mehr Enterotoxin gefunden als in dem nur aus 3% Pepton C/TLG bestehenden Medium. Am schlechtesten hinsichtlich ihrer Ergiebigkeit waren Mediumkombinationen mit PHP zu beurteilen. Da von anderen Untersuchern nicht die gleichen Medien getestet wurden, ist auch ein direkter Vergleich nicht möglich. Immerhin zeigte sich auch dabei, daß nur einige Mediumkombinationen besser geeignet waren als die Einzelkomponenten, in anderen Fällen aber durch Kombination von Proteinhydrolysaten nicht mehr Enterotoxin gewonnen werden konnte als durch ein Medium aus nur einem Proteinhydrolysat (BERGDOLL, 1962; KATO et al., 1966; REISER und WEISS, 1969; VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI, 1973). Auch bei Kombination verschiedener Proteinhydrolysate mit PHP wurde nicht immer mehr Enterotoxin pro ml registriert als bei Verwendung des Proteinhydrolysates ohne Zusatz von PHP (BERGDOLL, 1962; KATO et al., 1966; REISER und WEISS, 1969; VANDENBOSCH, FUNG und WIDOMSKI, 1973). Erklären lassen sich die Unterschiede vermutlich mit den unterschiedlichen Nährstoffbedürfnissen verschiedener Kulturen. REISER und WEISS (1969) registrierten

nämlich, daß *Staphylococcus aureus* S-6 in N-Z Amine NAK mehr Enterotoxin B bildete, der Stamm 243 (ATCC 14458) aber mehr in einer Kombination aus PHP plus N-Z Amine NAK.

BERGDOLL (1962), KATO et al. (1966), DRYE und MAH (1969) sowie WU und BERGDOLL (1971 b) hatten bei ihren Untersuchungen darauf hingewiesen, daß bei niedrigen Konzentrationen des Mediums weniger Enterotoxin/ml produziert wird als bei höheren Konzentrationen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der eigenen Untersuchungen auch festzustellen versucht, ob durch Veränderung der zuvor geprüften Mediumkonzentration (3% bzw. bei den Kombinationen 6%) noch eine Verbesserung der Enterotoxinbildung möglich ist. Mit Ausnahme des neutralen Fleischpeptons, das in 4%iger und 5%iger Konzentration deutlich bessere Enterotoxinausbeuten erbrachte, zeigten sich bei den drei anderen getesteten Medien (Serva-Pepton L/ELB, Serva-Pepton C/TLG sowie PHP) keinerlei eindeutige Vorteile bei Verwendung höherer Nährbodenkonzentrationen. Mit 6%igen Medien wurde in keinem Fall das beste Ergebnis erzielt, bei PHP sogar das schlechteste. Auch bei den Kombinationen aus jeweils zwei Proteinhydrolysaten wurde bei einer Gesamtkonzentration der Nährbodenbestandteile von 4% mehr Enterotoxin nachgewiesen als bei 6%. KATO et al. (1966), die den Einfluß verschiedener Konzentrationen (1% bis 6%) von N-Z Amine NAK bzw. PHP auf die Produktion von Enterotoxin A prüften, erhielten etwas mehr Enterotoxin bei 6%iger PHP-Konzentration (50 ml Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben), während bei N-Z Amine NAK ähnliche Ergebnisse registriert wurden wie in den eigenen Versuchen (mit Ausnahme des neutralen Fleischpeptons). Auch die Kombination aus PHP plus N-Z Amine NAK erwies sich in 6%iger Konzentration günstiger als in 4%iger. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß es sich um einen Staphylokokkenstamm handelte, der Enterotoxin A und nicht Enterotoxin B produzierte. Zwischen diesen Typen

scheinen jedoch hinsichtlich der Art und des Zeitpunkts der Enterotoxinbildung deutliche Unterschiede zu bestehen (MARKUS und SILVERMAN, 1970). Die eigenen Ergebnisse lassen sich vermutlich so erklären, daß einerseits 1%ige bzw. 2%ige (bei neutralem Fleischpepton auch 3%ige) Nährmedien zu wenig Nährstoffe für eine optimale Enterotoxinproduktion enthalten, andererseits aber bei den 6%igen Medien entweder die Wasseraktivität bereits entscheidend herabgesetzt ist (TROLLER, 1971 und 1972) oder aber anfänglich in großer Menge gebildete Stoffwechselprodukte eine stärkere Enterotoxinproduktion verhindern.

Für eine optimale Vermehrung der Staphylokokken und Bildung von Enterotoxin scheinen, speziell bei Verwendung von Proteinhydrolysaten, Zusätze erforderlich zu sein (BERGDOLL, 1970). Als solche wurden in eigenen Versuchen Fleischextrakt, Dikaliumhydrogenphosphat, Magnesiumsulfat, Maltose oder verschiedene Vitamine - Thiamin, Nicotinsäure, Calciumpantothenat, Biotin, Pyridoxal-5-phosphat - eingesetzt. Eine Steigerung der Enterotoxinproduktion wurde jedoch nur bei Zusatz von Fleischextrakt sowie Vitaminen registriert. Offensichtlich ist in dem für die Untersuchungszwecke verwendeten Medium aus Serva-Pepton C/TLG im Gegensatz zu N-Z Amine A (BERGDOLL, 1962; KATO et al., 1966) ein Zusatz von 0,1% K_2HPO_4 nicht erforderlich, sondern eher ungünstig. Auch wenn den analytischen Daten hinsichtlich der Bestandteile des Peptons kein Hinweis auf den Gehalt an K^+ zu entnehmen ist, so darf aufgrund der Ergebnisse doch die Schlußfolgerung gezogen werden, daß entweder die K^+ zugeschriebene Wirkung auch anderen Ionen zukommen kann oder das Medium auch K^+ enthielt. Bei zu hohem Gehalt an K^+ ist nämlich mit einer Hemmung des Staphylokokkenwachstums zu rechnen (HAYNES, KUEHNE und RHODES, 1954; FRIEDMAN, 1966). Bei Maltose, die nach

D'ARCA SIMONETTI (1965) bei Zusatz zum Hirn-Herz-Medium besonders hohe Enterotoxinausbeuten ermöglichte, war zwar nach 24stündiger Inkubation ein positiver Effekt gegenüber der zusatzfreien Kontrolle festzustellen, nicht aber nach 48 Std. Möglicherweise ist dieser unterschiedliche Einfluß der Maltose darauf zurückzuführen, daß sie selbst oder ihre ersten Abbaustufen den Staphylokokken eine zusätzliche Nährstoff- oder Energiequelle bieten, während die späteren Stoffwechselprodukte - ebenso wie bei Glucosezusatz (MORSE, MAH und DOBROGOSZ, 1969; MORSE und BALDWIN, 1971; MILLER und FUNG, 1973; sowie MORSE und MAH, 1973) - hemmend auf Staphylokokkenwachstum wie auch Enterotoxinsynthese wirkten.

Die positive Wirkung des Fleischextraktes im Medium aus Serva-Pepton C/TLG bzw. aus Serva-Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton überrascht insofern nicht, als sowohl dieser Extrakt wie auch Hefeextrakt nach KNIGHT (1937 a und b) den für das Wachstum von *Staphylococcus aureus* essentiellen Faktor enthalten. Dieser konnte durch Thiamin und Nicotinsäure ersetzt werden. Aus den Angaben des Oxoid-Handbuches geht auch hervor, daß der verwendete Fleischextrakt im Durchschnitt 922 ppm Nicotinsäure enthält. Allerdings dürfte auch noch anderen Faktoren des Fleischextraktes eine Bedeutung zukommen, da die gleichen Basalmedien mit 0,001% Nicotinsäure anstelle von 0,2% Fleischextrakt sogar etwas schlechtere und mit der Kontrolle übereinstimmende Resultate erbrachten.

Die anderen eingesetzten Vitamine ermöglichten eine deutlich bessere Enterotoxinproduktion als die vitaminfreie Kontrolle. Dies war nicht unbedingt zu erwarten, auch wenn PORTER und PELCZAR (1940) sowie MAH, FUNG und MORSE (1967) dem Biotin,

SEVAG und GREEN (1944) sowie SURGALLA (1947) dem Calciumpantothenat einen das Wachstum von *Staphylococcus aureus* stimulierenden Effekt zuschrieben. Demgegenüber fanden SURGALLA (1947) bei Biotin, PORTER und PELCZAR (1940) bei Pantothensäure keinen positiven Einfluß. Über die Wirkung von Pyridoxalphosphat waren in dieser Hinsicht keine Literaturangaben zu finden. Der Effekt der Vitamine war dabei abhängig von ihrer Konzentration. Am vorteilhaftesten war der Zusatz von Thiamin in Konzentrationen von 0,05% bis 0,00005%, wobei im Medium mit 0,005% Thiamin etwas mehr Enterotoxin B nachgewiesen wurde als bei den anderen Konzentrationen. Die Ergebnisse von BERGDOLL (1970), der bei Verwendung von PHP mit 0,001% Nicotinsäure sehr viel mehr Enterotoxin fand (210 mcg/ml) als bei Zusatz von Thiamin (15 mcg/ml) konnten somit weder für Serva-Pepton C/TLG noch für die Kombination aus Serva-Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton bestätigt werden. Selbst bei Kombination von Thiamin und Nicotinsäure wurden in den eigenen Versuchen - ebenfalls im Gegensatz zu BERGDOLL (1970) - niedrigere Enterotoxinkonzentrationen/ml gefunden als bei Verwendung von Thiamin allein. Nur die Kombination von 0,001% Pyridoxalphosphat plus 0,0001% Calciumpantothenat, erwies sich bei wiederholten Vergleichen dem Zusatz von 0,005% Thiamin leicht überlegen. Der Unterschied der Ergiebigkeit der beiden Medien war nach 24 Std. Bebrütung meist sehr erheblich, nach 48 Std. jedoch durchwegs nurmehr gering. Die Vitamine Pyridoxalphosphat und Pantothensäure haben im intermediären Stoffwechsel folgende Wirkung: Pyridoxalphosphat bildet beim Abbau der Aminosäuren mit diesen sog. Schiffsche Basen, über welche eine Umwandlung der Aminosäuren untereinander möglich ist. Pantothensäure bildet einen Bestandteil des Coenzym A, das für die Einfädelung verschiedener Stoffwechselprodukte in den Citratzyklus bzw. in die Atmungskette verantwortlich ist, die der Energiegewinnung im lebenden Organismus dienen. Es ist vorstellbar, daß es durch das

Zusammenwirken der beiden Vitamine zu einer für die Enterotoxinbildung optimalen Aminosäurenbalance sowie zum verstärkten Energiegewinn kommt.

Als optimal zur Bildung von Enterotoxin B in dem Medium aus Pepton C/TLG ohne Vitaminzusatz bzw. in dem Medium aus Pepton L/ELB plus neutralem Fleischpepton unter Zusatz von Pyridoxalphosphat und Calciumpantothenat erwies sich die Einstellung des Anfangs-pH-Wertes auf 7,0. Allerdings waren die auf pH 6,8 bzw. 7,2 eingestellten Medien nur wenig schlechter in ihrer Erergiebigkeit. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit denen von KATO et al. (1966), REISER und WEISS (1969) sowie MARKUS und SILVERMAN (1969) und BERGDOLL (1970) überein. Zwar konnte nach BERGDOLL (1962) in 2% PHP bei pH 6,0 am meisten Enterotoxin produziert werden (290 mcg/ml), doch wurde bei pH 7,0 nicht erheblich weniger Enterotoxin gefunden (260 mcg/ml). Dazu paßt auch, daß KATO et al. (1966) bzw. REISER und WEISS (1969) über eine maximale Enterotoxinbildung bei Einstellung des Mediums auf pH 6,0 bis 7,0 bzw. 6,8 berichteten. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, daß die geringen Unterschiede hinsichtlich des optimalen pH-Wertes auch durch die differierende Zusammensetzung des Mediums bedingt sein können. So hatten MARKUS und SILVERMAN (1969) bei einem nährstoffärmeren Medium mit einem Anfangs-pH von 8,0 bis 8,5 die höchsten Enterotoxinmengen gewonnen, während beim gleichzeitig eingesetzten Proteinhydrolysat pH-Werte im Bereich von 7,0 bis 7,5 besser waren.

Da über den Einfluß der Pufferung der Medien unterschiedliche Ansichten in der Literatur zu finden waren, wurden auch un-
pufferte und gepufferte Medien (Anfangs-pH 6,8 bis 7,2) auf ihre

Leistungsfähigkeit hin vergleichend geprüft. Selbst bei nur 0,005 molarer Konzentration des Puffers wurde bereits weniger Enterotoxin gefunden als in dem ungepufferten Medium. Besonders groß war die Differenz bei den Medien mit 0,1 m Puffer. Zu ähnlichen Ergebnissen waren auch MARLAND (1966) sowie BERGDOLL (1970) gekommen, während METZGER et al. mit einem auf pH 7,0 eingestellten und kontrollierten Medium mehr Enterotoxin produzierten als mit dem gleichen auf pH 6,6 eingestellten, aber nicht kontrollierten Medium. Wenn allerdings der Anfangs-pH von 6,0 bzw. 8,0 anstatt pH 7,0 beibehalten wurde, war eine erhebliche Abnahme in der Ergiebigkeit - auch gegenüber dem unkontrollierten Medium - zu verzeichnen.

Im Hinblick auf die Angaben anderer Autoren, daß es durch zusätzliche direkte und indirekte Belüftung der Medien (SURGALLA et al., 1951; MARLAND, 1966; McLEAN, LILLY und ALFORD, 1968; MARKUS und SILVERMAN, 1968 und 1969; BAIRD-PARKER, 1971; BARBER und DEIBEL, 1972) zu einer besseren Enterotoxinbildung kommt als in nicht extra belüfteten oder gar unter anaeroben Bedingungen bebrüteten Medien, wurde in eigenen Versuchen der Einfluß der Zufuhr verschiedener Gase (direkte Belüftung) sowie jener von Schüttelgeschwindigkeit und Verhältnis von Nährbodenmenge zu Gefäßvolumen (indirekte Belüftung) geprüft. Bei Einleitung von Sauerstoff, Kohlendioxyd oder Stickstoff wurde festgestellt, daß reiner Sauerstoff in einer Durchflußrate von 20 - 30 ccm/min. pro 400 ml Medium eine Stimulierung der Enterotoxinbildung bewirkte. Im Gegensatz dazu war bei "Belüftung" mit CO₂ eine Abnahme der Enterotoxinmenge/ml im Vergleich zur unbelüfteten Kontrolle zu beobachten, während durch N₂ die Enterotoxinbildung über 24 Std. lang verhindert wurde.

Die eigenen Ergebnisse liegen somit auf der gleichen Ebene wie die Angaben von MARLAND (1966), STARK und MIDDLEDAUGH (1970), BAIRD-PARKER (1971) sowie BARBER und DEIBEL (1972). MARLAND (1966) hatte zwar keinen Vorteil von Sauerstoff gegenüber Luft feststellen können (20 cc/min/500 ml) - dieser Vergleich wurde bei den eigenen Versuchen nicht angestellt - hatte jedoch auch einen deutlich nachteiligen Effekt hinsichtlich der Zufuhr von CO₂ registriert. Auch STARK und MIDDLEDAUGH (1970) sowie BAIRD-PARKER (1971) hatten auf den im Hinblick auf die Enterotoxinbildung nachteiligen Einfluß hingewiesen. Die Ergebnisse bezüglich der günstigsten Schüttelgeschwindigkeit bestätigen die Angaben von DIETRICH, WATSON und SILVERMAN (1972), daß von *Staphylococcus aureus* S-6 bei 350 U/min. am meisten Enterotoxin gebildet wird. Etwas weniger Enterotoxin wurde bei der von KATO et al. (1966) zur Produktion von Enterotoxin A empfohlenen Schüttelgeschwindigkeit von 280 U/min. gewonnen. Selbst bei 100 U/min. wurden jedoch noch erheblich größere Enterotoxinmengen produziert als in statischen Kulturen. Auch das Verhältnis von Menge des Mediums zu Fassungsvermögen des Kulturgefäßes nahm Einfluß auf die Enterotoxinbildung. So konnte festgestellt werden, daß in 2 l-Erlenmeyerkolben mit 200 ml Medium die Enterotoxinausbeute am höchsten war (20 mcg/ml), bei 100 bzw. 400 ml jedoch nur etwas geringer (18 bzw. 18,5 mcg/ml). Aufgrund der mit der bei Einsatz von 400 ml Medium zu erzielenden höheren Enterotoxinausbeute pro Erlenmeyerkolben (z.B. 7400 mcg bei 400 ml gegenüber 4000 mcg bei 200 ml) wurde der größeren Menge der Vorzug gegeben. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von KATO et al. (1966) berichtet. Diese Autoren erhielten zwar den höchsten Ertrag an Enterotoxin A bei Verwendung von 15 ml Medium in 250 ml-Erlenmeyerkolben, empfahlen aber für die Produktion größerer Toxinmengen 400 - 600 ml Medium in 2 l-Erlenmeyerkolben zu bebrüten. WU und BERGDOLL (1971 b) bevorzugten 400 ml pro 2 l-Erlenmeyerkolben, während nach DIETRICH, WATSON

und SILVERMAN (1972) der Enterotoxinertrag auf beinahe das Doppelte anstieg, wenn 100 ml beimpften Mediums nicht in 500 ml-Erlenmeyerkolben, sondern in 1 l-Erlenmeyerkolben bebrütet wurden. Aus diesen Angaben wird ersichtlich, daß stärkere Bewegung der Kulturflüssigkeit wie auch ein relativ weites Verhältnis Nährbodenmenge zu Gefäßvolumen eine bessere Sauerstoffversorgung der Staphylokokken gewährleisten. Es ist außerdem zu berücksichtigen, daß sowohl bei der direkten als auch indirekten Belüftung das Medium besser durchmischt wird als bei statischen Kulturen und die Keime besser mit Nährstoffen versorgt werden. Außerdem werden evtl. auch das Keimwachstum negativ beeinflussende Stoffwechselprodukte freigesetzt.

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß der pH-Wert des 24 bzw. 48 Std. bebrüteten Mediums keine eindeutigen Rückschlüsse auf die gebildeten Enterotoxinmengen zuließ. So wurden selbst bei negativem Enterotoxinnachweis pH-Werte über 8,0 registriert, während andererseits bei einem pH von 6,6 Enterotoxin gefunden wurde. Auch aus den von KATO et al. (1966) beschriebenen Untersuchungsergebnissen wird ersichtlich, daß vom End-pH-Wert eines Mediums bzw. von der Differenz gegenüber dem Anfangs-pH nicht auf die Ergiebigkeit geschlossen werden kann. Von größerer Aussagekraft scheint die Veränderung des pH-Wertes während der Wachstumsphasen der Bakterien zu sein, da, wie in Voruntersuchungen bestätigt werden konnte, Enterotoxin B erstmals nachzuweisen ist, wenn nach 5 - 6 Std. der pH-Wert nach anfänglichem Abfall wieder zu steigen beginnt (MARLAND, 1966; McLEAN, LILLY und ALFORD, 1968; MORSE, MAH und DOBROGOSZ, 1969).

Ebensowenig ließ sich aus der Zunahme der bei 655 nm gemessenen optischen Dichte (KATO et al., 1966), die als Maß für das Wachstum der Keime diskutiert wird, wie auch aus den anfänglich nach dem Koch'schen Plattenverfahren ermittelten Keimzahlen, die

Bildung von Enterotoxin B beurteilen. So wies PHP in einer Versuchsreihe die stärkste Zunahme der optischen Dichte bzw. die höchste Keimzahl auf, ohne jedoch die beste Enterotoxinausbeute zu ergeben. Ähnliche Resultate hinsichtlich der optischen Dichte lassen sich auch aus den Untersuchungen von KATO et al. (1966) sowie MAH, FUNG und MORSE (1967) ableiten. Ebenso berichtete MARLAND (1966), der den Keimgehalt mittels Plattenverfahren bzw. Bestimmung des Trockengewichtes ermittelte, daß im Rahmen der von ihm durchgeführten Untersuchungen trotz vermehrten Keimwachstums keine verstärkte Enterotoxinbildung zu verzeichnen war. McLEAN, LILLY und ALFORD (1968) wiesen darauf hin, daß die Enterotoxinproduktion nicht untrennbar mit dem Bakterienwachstum verbunden ist, zumal der Toxintiter 16 - 20 Std. lang anstieg, die Staphylokokken aber bereits nach 7 - 9 Std. die stationäre Wachstumsphase erreicht hatten. Auch WU und BERGDOLL (1971 a) kamen zu dem Ergebnis, daß gute Enterotoxinbildung zumeist mit Staphylokokkenwachstum verbunden ist, gutes Wachstum aber keinesfalls auch gute Enterotoxinbildung bedingt. Die Höhe der gebildeten Enterotoxinmengen hängt ab von der Anwesenheit essentieller Nährstoffe und anderer Faktoren, die das Wachstum günstig beeinflussen können, aber nicht müssen. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei der Messung der optischen Dichte nicht auch Abbauprodukte der Mediumbestandteile erfaßt werden. Daher ist es unerlässlich, daß bei der Prüfung der Leistungsfähigkeit verschiedener Medien oder bei der Ermittlung des Enterotoxinbildungsvermögens von Staphylokokken der Enterotoxingehalt mittels arbeits- und kostenaufwendiger serologischer Verfahren bestimmt wird und nicht aus pH-Wert oder optischer Dichte (bzw. Keimzahl/ml) abgeschätzt wird.

Auch wenn die in den verschiedenen Versuchsreihen erzielten Ergebnisse aufgrund der Abnahme des Enterotoxinbildungsvermögens

des verwendeten Stammes nicht direkt miteinander vergleichbar waren und die Eignung der Medien der zu verschiedenen Zeiten durchgeführten Versuche nur in Relation zu einem stets mitlaufenden, zwar bereits auf seine Eignung geprüften Medium beurteilt werden konnte, ist folgende Aussage, die sich bei wiederholten Tests bestätigen ließ, erlaubt:

Für die Produktion von Enterotoxin B in relativ großen Mengen kann die Anwendung eines Mediums aus 2% Serva-Pepton L/ELB plus 2% neutralem Fleischpepton (Oxoid) unter Zusatz von 0,0001% Calciumpantothenat und 0,001% Pyridoxalphosphat empfohlen werden. Bei Zusatz von 0,005% Thiamin statt der erwähnten Vitaminkombination werden jedoch nach 48 Std. Bebrütung bei 37°C nur unwesentlich schlechtere Ergebnisse erzielt, nach 24 Std. ist der Unterschied in der Ergiebigkeit beträchtlich. Nach Einstellung des Mediums auf pH 7,0 werden optimalerweise 20 ml einer Staphylokokkenkultur zu 400 ml Medium (in einem 2 l-Erlenmeyerkolben) gegeben. Als Schüttelgeschwindigkeit empfehlen sich 350 U/min. Eine zusätzliche Steigerung der Enterotoxinsynthese kann zwar durch Einleitung von reinem Sauerstoff (20 - 30 ccm/min/400 ml Medium) erzielt werden, ist jedoch aufgrund der schwierigen Durchführung nicht empfehlenswert.

5. Zusammenfassung

1. 17 Proteinhydrolysate und Hirn-Herz-Medium wurden auf ihre Er-
giebigkeit in der Produktion von Enterotoxin B (*Staphylococcus*
aureus S-6) geprüft. Außerdem wurde der Einfluß verschiedener
Zusätze (Fleischextrakt, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, Maltose, Thiamin,
Calciumpantothenat, Biotin und Pyridoxalphosphat), des Anfangs-pH
des Mediums, der Schüttelgeschwindigkeit des Brutschranks, der
Zufuhr von Sauerstoff, Kohlendioxyd oder Stickstoff, des Ver-
hältnisses von Nährbodenmenge zu Gefäßvolumen sowie der Einsaat-
menge getestet.
2. Folgende Ergebnisse wurden hinsichtlich der Nährbodenzusammen-
setzung erzielt: Für die Produktion von Enterotoxin B erwies sich
die Bouillon aus 2% Pepton L/ELB (Pepticase) und 2% neutralem
Fleischpepton als am besten geeignet. Unter den nichtkombinierten
Medien war jenes aus 3% Pepton C/TLG (N-Z Amine AS) am besten.
Durch Zusatz von 0,0001% Calciumpantothenat und 0,001% Pyridoxal-
phosphat konnte der Enterotoxinertrag deutlich gesteigert werden.
Etwas weniger gute Resultate wurden mit 0,005% Thiamin erzielt.
Alle anderen Zusätze erwiesen sich als weniger geeignet.
3. Bei Einstellung der erwähnten Medien auf pH 7,0 wurden die besten
Ergebnisse registriert.
4. Durch Erhöhung der Schüttelgeschwindigkeit von 100 auf 350 U/min
bzw. durch Zufuhr von reinem Sauerstoff (20 - 30 ccm/min/400 ml)
ist eine Steigerung der Enterotoxinausbeute möglich. Bei Ein-
leitung von Stickstoff wurden innerhalb von 24 Stunden keine nach-
weisbaren Mengen von Enterotoxin B gebildet.
5. Der beste Enterotoxinertrag wurde - bei Verzicht auf Zufuhr reinen
Sauerstoffs - beobachtet, wenn das in 2 l-Erlenmeyerkolben in
Mengen zu 200 ml abgefüllte Medium mit 10 ml einer aktiven
Staphylokokkenkultur beimpft wird.

Summary

1. 17 protein hydrolysates and brain-heart-infusion broth (Oxoid) were tested on their results in production of enterotoxin B (Staphylococcus aureus S-6). Besides this the influence of the different supplements (meat extract, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, maltose, thiamine, calciumpantothenate, biotine, and pyridoxalphosphate), the initial pH of the medium, the shaking speed of the incubator, the supply of oxygen, carbondioxyde or nitrogen, the ratio medium-to-flask volume as well as the inoculum were investigated.
2. Considering the composition of the medium following results were found: For the production of enterotoxin B a broth of 2% peptone L/ELB (peptidase) and 2% neutralized peptone bacteriological was found to be most suitable. Under the non-combined media the broth of 3% peptone C/TLB (N-Z Amine AS) seemed to be the best. There was a remarkable increase of enterotoxin by addition of 0.0001% calciumpantothenate and 0.001% pyridoxalphosphate. With 0.005% thiamine the results were approximately as good as the results of the mentioned media. All other supplements were less suitable.
3. The best results were registered after adjusting the pH in the named media to 7.0.
4. Increasing the shaking speed from 100 to 350 rpm, or by aeration with pure oxygen ($20 - 30 \text{ cm}^3/\text{min}/400 \text{ ml}$) an increase of enterotoxin production is possible. By addition of nitrogen no enterotoxin was produced during 24 hours.
5. The highest amount of enterotoxin was recorded - if no pure oxygen was used - when the medium (200 ml in a 2000 ml-Erlenmeyer-flask) was inoculated with 10 ml of an active culture of Staphylococcus aureus S-6.

6. SCHRIFTTUMSVERZEICHNIS

ACHORN, G.B. und J.L. SCHWAB (1948):

A method for the aeration of liquid cultures of microorganisms.
Sci. 107, 377 - 378.

ANGELOTTI, R. (1969):

Staphylococcal intoxications.

in Riemann, H.: Food-borne infections and intoxications.

I. Aufl., Academic Press, New York und London, 359 - 393.

AVENA, R.M. und M.S. BERGDOLL (1967):

Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C Staphylococcus aureus strain 361.

Biochemistry 6, 1474 - 1480.

BAIRD-PARKER, A.C. (1971):

Factors affecting the production of bacterial food poisoning toxins.

J. Appl. Bact. 34, 181 - 197.

BARBER, L.E. und R.H. DEIBEL (1972):

Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage.

Appl. Microbiol. 24, 891 - 898.

BERGDOLL, M.S. (1962):

Chemistry and detection of staphylococcal enterotoxin.

Proc. 14th Res. Conf. Am. Meat Inst. Found., Circ. No. 70, 47 - 53.

DERSELBE (1969):

Bacterial toxins in food.

Food Technol. 23, 530 - 533.

DERSELBE (1970):

Enterotoxins.

in Montie, T.C., S. Kadis und S.J. Ajl:

Microbial toxins, Vol. 3.

Academic Press, New York und London, 265 - 326.

DERSELBE (1972):

The enterotoxins.

in Cohen, J.O.:

The staphylococci.

Wiley Interscience, New York, London, Sydney, Toronto, 301 - 331.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA und R.M. AVENA (1965):

Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C.

J. Bact. 90, 1481 - 1485.

BERGDOLL, M.S., M.J. SURGALLA und G.M. DACK (1959):

Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property.

J. Immunol. 83, 334 - 338.

BERGDOLL, M.S., K.F. WEISS und M.J. MUSTER (1967):

The production of staphylococcal enterotoxin by a coagulase-negative microorganism.

Bact. Proc., S. 12.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA, R.N. ROBBINS und K.F. WEISS (1971):

Identification of enterotoxin E.

Infec. Immun. 4, 593 - 595.

BORJA, C.R. und M.S. BERGDOLL (1967):

Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by Staphylococcus aureus strain 137.

Biochemistry 6, 1467 - 1473.

BURBIANKA, M. (1969):

Enterotoksyna Gronkowcowa.

(Staphylokokken-Enterotoxin)

Roczn. Państw. Zakł. Hig. 20, 55 - 62.

Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 222 (1970), 309.

BURNET, F.M. (1930):

The production of staphylococcus toxin.

J. Path. Bact. 33, 1 - 16.

DERSELBE (1931):

The interactions of staphylococcus toxin, anatoxin and antitoxin.

J. Path. Bact. 34, 471 - 492.

CASMAN, E.P. (1938):

The production of staphylococcus toxin in fluid media.

J. Bact. 35, 13.

DERSELBE (1940 a):

Further studies on the production of staphylococcal alpha-hemolysin in fluid media.

J. Bact. 39, 84.

DERSELBE (1940 b):

The production of staphylococcal alpha-hemolysin: the role of agar.

J. Bact. 40, 601 - 617.

DERSELBE (1958):

Serologic studies of staphylococcal enterotoxin.

Publ. Health Rep. 73, 599 - 609.

CASMAN, E.P. und R.W. BENNETT (1963):

Culture medium for the production of staphylococcal enterotoxin A.

J. Bact. 86, 18 - 23.

CASMAN, E.P., M.S. BERGDOLL und J. ROBINSON (1963):

Designation of staphylococcal enterotoxins.

J. Bact. 85, 715 - 716.

CASMAN, E.P., R.W. BENNETT, A.E. DORSEY und J.A. ISSA (1967):

Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D.

J. Bact. 94, 1875 - 1882.

CHRISTIAN, J.H.B. und J.A. WALTHO (1962):

The water relations of staphylococci and micrococci.

J. Appl. Bact. 25, 369 - 377.

CZOP, J.K. und M.S. BERGDOLL (1970):

Synthesis of enterotoxin by L-forms of *Staphylococcus aureus*.

Infec. Immun. 1, 169 - 173.

DACK, G.M., W.E. CARY, O. WOOLPERT und H. WIGGERS (1930):

An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow hemolytic staphylococcus.

J. Prev. Med. 4, 167 - 175.

D'ARCA SIMONETTI, A. (1965):

Sulla Tossino-genesi in vitro dello stafilococco enterotossico.

Nuovi Ann. Igiene Microbiol. 16, 291 - 306.

Zit. nach BERGDOLL, M.S. (1972).

DIETRICH, G.G., R.J. WATSON und G.J. SILVERMAN (1972):

Effect of shaking speed on the secretion of enterotoxin B
by *Staphylococcus aureus*.

Appl. Microbiol. 24, 561 - 566.

DOLMAN, C.E. (1934):

Ingestion of staphylococcus exotoxin by human volunteers.

J. Infec. Dis. 55, 172 - 183.

DOLMAN, C.E. und R.J. WILSON (1938):

Experiments with staphylococcal enterotoxin.

J. Immunol. 35, 13 - 30.

DONNELLY, C.B., J.E. LESLIE, L.A. BLACK und K.H. LEWIS (1967):

Serological identification of enterotoxigenic staphylococci
from cheese.

Appl Microbiol. 15, 1382 - 1387.

DORNBUSCH, K., H.O. HALLANDER und F. LÖFQUIST (1969):

Extrachromosomal control of methicillin resistance and toxin
production on *Staphylococcus aureus*.

J. Bact. 98, 351 - 358.

DRYE, R.J. und R.A. MAH (1969):

Stimulation of the differential rate of enterotoxin B synthesis
in *Staphylococcus aureus* S-6 by components in casein hydrolysate.

Bact. Proc. p. 10.

DUTHIE, E.S. und J.A.H. WYLIE (1945):

The influence of shaking on the vitro production of soluble bacterial toxins.

Brit. J. Exp. Pathol. 26, 130 - 136.

FAVORITE, G.O. und W. McD. HAMMON (1941):

The production of staphylococcus enterotoxin and alpha-hemolysis in a simplified medium.

J. Bact. 41, 305 - 316.

FREA, J.I., E. MCCOY und F.M. STHONG (1963):

Purification of type B staphylococcal enterotoxin.

J. Bact. 86, 1308 - 1313.

FRIEDMAN, M.E. (1966):

Inhibition of staphylococcal enterotoxin B formation in broth cultures.

J. Bact. 92, 277 - 278.

DERSELBE (1968):

Inhibition of staphylococcal enterotoxin B formation by cell wall blocking agents and other compounds.

J. Bact. 95, 1051 - 1055.

FRIEDMAN, M.E. und M.B. HOWARD (1971):

Induction of mutants of Staphylococcus aureus 100 with increased ability to produce enterotoxin A.

J. Bact. 106, 285 - 291.

FRIEDMAN, M.E. und J.D. WHITE (1965):

Immunofluorescent demonstration of cell-associated staphylococcal enterotoxin B.

J. Bact. 88, 1155.

GENIGEORGIS, C. und W.W. SADLER (1966):

Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin G production.

J. Bact. 92, 1363 - 1367.

GENIGEORGIS, C., M.S. FODA, A. MANTIS und W.W. SADLER (1971):

Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production.

Appl. Microbiol. 21, 862 - 866.

GENIGEORGIS, C., S. MARTIN, C.E. FRANTI und H. RIEMANN (1971):

Initiation of staphylococcal growth in laboratory media.

Appl. Microbiol. 21, 934 - 939.

GLADSTONE, G.P. (1937):

The nutrition of *Staphylococcus aureus*; nitrogen requirements.

Brit. J. Exp. Pathol. 18, 322 - 333.

GLADSTONE, G.P. (1938):

The production of staphylococcal alpha-hemolysis in a chemically defined medium.

Brit. J. Exp. Pathol. 19, 203 - 226.

HALL, H.E., R. ANGELOTTI und K.H. LEWIS (1963):
Quantitative detection of staphylococcal enterotoxin B in
food by gel-diffusion methods.
Publ. Health Rep. 78, 1085 - 108d.

DIESELBEN (1965):
Detection of the staphylococcal enterotoxins in food.
Health Lab. Sci. 2, 175 - 191.

HALLANDER, H.O. (1965):
Production of large quantities of enterotoxin B and
other staphylococcal toxins on solid media.
Acta path. et microbiol. scand. 63, 299 - 305.

HALLANDER, H.O. und B. KÖRLOF (1967):
Enterotoxin producing staphylococci.
Acta path. et microbiol. scand. 71, 359 - 375.

HAYNES, W.C., R.W. KUEHNE und L.J. RHODES (1954):
The effect of potassium upon the growth of *Micrococcus*
pyogenes.
Appl. Microbiol. 2, 339 - 344.

HEROLD, J.D., J.S. SCHULTZ und P. GERHARDT (1967):
Differential dialysis culture for separation and con-
centration of a macromolecular product.
Appl. Microbiol. 15, 1192 - 1197.

HINDS, A.E. und G.X. PETERSON (1963):

Method for standardizing staphylococcal suspensions:

Relationship of optical density to viable cell count.

J. Bact. 86, 168.

HOJVAT, S.A. und H. JACKSON (1969):

Effects of sodium chloride and temperature on the growth

and production of enterotoxin B by Staphylococcus aureus.

Can. Inst. Food Technol. J. 2, 56 - 59.

JAMLANG, E.M., M.L. BARTLETT und H.E. SNYDER (1971):

Effect of pH, protein concentration, and ionic strength

on heat inactivation of staphylococcal enterotoxin B.

Appl. Microbiol. 22, 1034 - 1040.

JARVIS, A.W. und R.C. LAWRENCE (1970):

Production of high titers of enterotoxins for the routine

testing of staphylococci.

Appl. Microbiol. 19, 698 - 699.

KATO, E., M. KHAN, L. KUJOVICH und M.S. BERGDOLL (1966):

Production of enterotoxin A.

Appl. Microbiol. 14, 966 - 972.

KNIGHT, B.C.J.G. (1937 a):

The nutrition of Staphylococcus aureus; nicotinic acid

and vitamin B₁.

Biochem. J. 31, 731 - 737.

DERSELBE (1937 b):

The nutrition of *Staphylococcus aureus*. The activities of nicotin-amide, aneurin (vitamin B₁) and related compounds. *Biochem. J.* 31, 966 - 973.

LACHICA, R.V., K.F. WEISS und R.H. DEIBEL (1969):

Relationship among coagulase, enterotoxin and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 18, 126 - 127.

LECHOWICH, R.V., J.B. EVANS und C.F. NIVEN (1956):

Effect of curing ingredients and procedures on the survival and growth of staphylococci in and on cured meat. *Appl. Microbiol.* 4, 360 - 363.

MAH, R.A., D.Y.C. FUNG und S.A. MORSE (1967):

Nutritional requirements of *Staphylococcus aureus* S-6. *Appl. Microbiol.* 15, 866 - 870.

MARKUS, Z. (1969):

Enterotoxin B synthesis by *Staphylococcus aureus* S-6. *Bact. Proc.* p. 81.

DERSELBE (1970):

Inhibition of enterotoxin B production by nontoxigenic variants of *Staphylococcus aureus* S-6. *Bact. Proc.* p. 114.

MARKUS, Z. und G.J. SILVERMAN (1968):
Enterotoxin B production by nongrowing cells of
Staphylococcus aureus.
J. Bact. 96, 1446 - 1447.

DIESELBEN (1969):
Enterotoxin B synthesis by replicating and non-
replicating cells of Staphylococcus aureus.
J. Bact. 97, 506 - 512.

DIESELBEN (1970):
Factors affecting the secretion of Staphylococcal entero-
toxin A.
Appl. Microbiol. 20, 492 - 496.

MARLAND, R.E. (1966):
The effects of several environmental factors on the growth
and enterotoxigenity of strain S-6 Staphylococcus aureus.
Ph.D. thesis Univ. North Carolina
Ref.: Diss. Abstr. 27 (1967), 3165 - 3166.

McLEAN, R.A., H.D. LILLY und J.A. ALFORD (1968):
Effects of meat-curing salts and temperature on production
of staphylococcal enterotoxin B.
J. Bact. 95, 1207 - 1211.

METZGER, J.F., A.D. JOHNSON, W.S. COLLINS II und
V. McCANN (1973):

Staphylococcus aureus, enterotoxin B release (excretion)
under controlled conditions of fermentation.

Appl. Microbiol. 25, 770 - 773.

MILLER, R.D. und D.Y.C. FUNG (1973):

Amino acid requirements for the production of entero-
toxin B by Staphylococcus aureus S-6 in a chemically defined
medium.

Appl. Microbiol. 25, 800 - 806.

MINOR, T.E. und E.H. MARTH (1972 a):

Staphylococcus aureus and staphylococcal food intoxications.
A review. II. Enterotoxins and epidemiology.

J. Milk Food Technol. 35, 21 - 29.

DIESELBEN (1972 b):

Production of staphylococcal enterotoxin A on cellophane-
over - agar.

Appl. Microbiol. 23, 833 - 834.

MITSUHASHI, S., M. MORIMURA, K. KONO und H. OSHIMA (1963):

Elimination of drug resistance of Staphylococcus aureus by
treatment with acriflavine.

J. Bact. 86, 162 - 164.

MITSUHASHI, S., H. OSHIMA, U. KAWAHARADA und H. HASHIMOTO (1965):
Drug resistance of staphylococci. I. Transduction of tetracycline
resistance with phage lysates obtained from multiply resistant
staphylococci.

J. Bact. 89, 967 - 976.

MORSE, S.A. und J.N. BALDWIN (1971):

Regulation of staphylococcal enterotoxin B: Effect of
thiamine starvation.

Appl. Microbiol. 22, 242 - 249.

MORSE, S.A. und R.A. MAH (1973):

Regulation of staphylococcal enterotoxin B. Effect of anaerobic
shock.

Appl. Microbiol. 25, 553 - 557.

MORSE, S.A., R.A. MAH und W.J. DOBROGOSZ (1969):

Regulation of staphylococcal enterotoxin B.

J. Bact. 98, 4 - 9.

MULLET, E. und M.E. FRIEDMAN (1961):

Inhibition of staphylococcal enterotoxin production in broth cultures.
Bact. Proc., p. 108.

ODDIN, J. (1952):

III. Techniques and analysis of the quantitative precipitin reaction.
B. Specific precipitation in gels and its application to the immuno-
chemical analysis.

Methods Med. Res. 5, 335 - 378.

PARFENTJEV, I.A. und A.R. CATELLI (1964):

Tolerance of Staphylococcus aureus to sodium chloride.

J. Bact. 88, 1 - 3.

PETERS, H.A. (1965):

Nutritional requirements of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus*.

Ph. D. thesis Univ. North Carolina

Ref.: Diss. Abstr. 26, (1966), 4971 - 4972.

PORTER, J.R. und M.J. PELCZAR (1940):

Biotin (Bios II_B, vitamin H) - an essential growth factor for certain staphylococci.

Science 91, 576 - 577.

RAMON, G., A. BOIVIN und R. RICHOU (1938):

Sur l'obtention de la toxine et de l'anatoxine staphylococciques dans un milieu de composition chimique définie.

Compt. Rend. Acad. Sci. 207, 466 - 468.

READ, R.B. und W.L. PRITCHARD (1963):

Lysogeny among the enterotoxigenic staphylococci.

Canad. J. Microbiol. 9, 879 - 889.

REISER, R.F. und K.F. WEISS (1969):

Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C in various media.

Appl. Microbiol. 18, 1041 - 1043.

ROSENWALD, A.J. und R.E. LINCOLN (1966):

Streptomycin inhibition of elaboration of staphylococcal enterotoxigenic protein.

J. Bact. 92, 279 - 290.

SCHEUSNER, D.L. (1972):

Effect of temperature and pH on production of staphylococcal enterotoxin in brain heart infusion broth and in food.

Diss. Abstr. Internat. B 33 (2), 836.

Ref.: FSTA 5 (1973), No. 02.

SCHEUSNER, D.L. und L.G. HARMON (1971):

Temperature range for production of four different enterotoxins by *Staphylococcus aureus* in BHI broth. Bact. Proc. p. 18.

SEGALOVE, H. (1947):

The effect of penicillin on growth and toxin production by enterotoxic staphylococci.

J. Infect. Dis. 81, 228 - 243.

SEGALOVE, M. und G.M. DACK (1941):

Relation of time and temperature to growth and enterotoxin production of staphylococci.

Food Res. 6, 127 - 133.

SEVAG, M.G. und M.N. GREEN (1944):

The role of pantothenic acid in the synthesis of tryptophane.

J. Biol. Chemistry 154, 719 - 720.

SIMKOVICOVA, M. und R.J. GILBERT (1971):

Serological detection of enterotoxin from foodpoisoning strains of *Staphylococcus aureus*.

J. Med. Microbiol. 4, 19 - 30.

STIEGL, H.-J. (1971):

Staphylokokken-Enterotoxine und ihr serologischer Nachweis.

Alimenta 10, 13 - 15.

SUGIYAMA, H., M.S. BERGDOLL und G.M. DACK (1960):

In vitro studies on staphylococcal enterotoxin production.

J. Bact. 80, 265 - 270.

SURGALLA, M.J. (1947):

A study of the production of staphylococcal enterotoxin in chemically defined mediums.

J. Infec. Dis. 81, 97 - 111.

SURGALLA, M.J. und K.E. HITE (1946):

Production of staphylococcal enterotoxin in chemically defined media.

Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 61, 244 - 245.

SURGALLA, M.J., M.S. BERGDOLL und G.M. DACK (1953):

Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey-feeding test.

J. Lab. Clin. Med. 41, 782 - 788.

SURGALLA, M.J., J.L. KADAVY, M.S. BERGDOLL und

G.M. DACK (1951):

Staphylococcal enterotoxin: Production methods.

J. Infec. Dis. 89, 160 - 184.

STARK, R.L. und P.R. WIDDAUGH (1970):

Immunofluorescence detection of enterotoxin B produced
under CO₂ and N₂ atmospheres.

Appl. Microbiol. 20, 519 - 520.

TATINI, S.R., B.R. CORDS, L.L. MCKAY und R.W. BENNETT (1971):

Effect of growth temperatures higher than optimal on
production of staphylococcal enterotoxins and deoxyribo-
nuclease.

Bact. Proc. p. 17.

TROLLER, J.A. (1971):

Effect of water activity on enterotoxin B production and
growth of *Staphylococcus aureus*.

Appl. Microbiol. 21, 435 - 439.

DERSELBE (1972):

Effect of water activity on enterotoxin A production and
growth of *Staphylococcus aureus*.

Appl. Microbiol. 24, 440 - 443.

UNTERMANN, F. (1972 a):

Verfahren zur Kultivierung von Staphylokokken für die
Gewinnung größerer Enterotoxinmengen.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 219, 426 - 434.

DERSELBE (1972 b):

Vergleich verschiedener Kultivierungsverfahren zum Nachweis von Enterotoxinen bei Staphylokokken-Stämmen.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 219, 435 - 448.

VANDENBOSCH, L.L., D.Y.C. FUNG und M. WIDOMSKI (1973):

Optimum temperature for enterotoxin production by Staphylococcus aureus S-6 and 137 in liquid medium.

Appl. Microbiol. 25, 498 - 500.

WADSWORTH, C. (1957):

A slide microtechnique for the analysis of immune precipitates in gel.

Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol. 10, 355 - 360.

WEIRETHER, F.J., E.E. LEWIS, A.J. ROSENWALD und

R.E. LINCOLN (1966):

Rapid quantitative serological assay of staphylococcal enterotoxin B.

Appl. Microbiol. 14, 284 - 291.

WEISS, K.F. und R.N. ROBBINS (1970):

Relationship between staphylococcal antiserum titer and zone development on immune serum plates.

Appl. Microbiol. 1970, 911 - 914.

WOODBURN, M., T.N. MORITA und S.Z. VENN (1973):

Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C in colloidal dispersions.

Appl. Microbiol. 25, 825 - 833.

WOOLPERT, O.C. und G.M. DACK (1933):

Relation of gastro-intestinal poison to other toxic substances produced by staphylococci.

J. Infec. Dis. 52, 6 - 19.

WU, C.-H. und M.S. BERGDOLL (1971 a):

Stimulation of enterotoxin B production. I. Stimulation by fractions from a pancreatic digest of casein.

Infec. Immun. 3, 777 - 783.

DIESELBEN (1971 b):

Stimulation of enterotoxin B production. II. Synthetic medium für staphylococcal growth and enterotoxin B production.

Infec. Immun. 3, 784 - 792.

Abschließend möchte ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas, für seine wissenschaftliche Anleitung sowie für seine großzügige Unterstützung bei der Ausführung meiner Arbeit meinen Dank aussprechen.

Besonders herzlich danke ich auch Herrn Dr. K.-J. Zaadhof für seine stete Hilfsbereitschaft und Beratung bei meinen Untersuchungen und der Durchsicht meiner Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für ihre stets gern gewährte Hilfeleistung.

Lebenslauf

Am 19.6.1948 wurde ich als Tochter des Frauenarztes Dr. Otto Richter und seiner Ehefrau Mathilde, geb. Hübner, in Hannover geboren. Von 1954 - 1958 besuchte ich die Grundschule, seit 1958 das humanistische Mädchen-gymnasium Sophienschule Hannover, wo ich am 14.9.1966 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1966/67 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Tier-ärztlichen Hochschule Hannover und setzte nach bestandener tierärztlicher Vorprüfung am 26.3.1969 mein Studium seit dem Sommersemester 1969 an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München fort. Den dritten Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung bestand ich am 12.4.1972. Am 1.8.1972 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.

